

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE DOS BIOINDICADORES DEL ESTADO
FUNCIONAL DE SELENIO**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA E
INGENIERO CIVIL QUIMICO

CLAUDIA ANDREA QUILODRÁN CORTÉS

PROFESOR GUÍA
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN
ANDREA MAHN OSSES
ÁLVARO OLIVERA NAPPA

SANTIAGO DE CHILE
OCTUBRE 2008

RESUMEN

El selenio es un nutriente esencial para los seres vivos. Recientemente se ha demostrado que la selenometilselenocisteína, forma orgánica de selenio, presenta efectos quimiopreventivos en cáncer de colon, pulmón, próstata y mama. Dado esto, se hace necesaria la identificación de biomarcadores capaces de indicar el estado funcional de selenio.

Mediante el uso de una aproximación proteómica en un modelo animal, se han determinado dos posibles bioindicadores. Ellos son las proteínas Transtiretina (TTR) y Apolipoproteína E (ApoE). Ambos presentaron un aumento en su expresión proporcional a la ingesta de selenometilselenocisteína. El presente trabajo de título pretende determinar las propiedades fisicoquímicas, peso molecular (PM), punto isoeléctrico (pI) e hidrofobicidad superficial promedio (HSP) de estos bioindicadores y estudiar un método de purificación preeliminar para la Transtiretina.

Para la determinación del PM y pI, se desarrollaron técnicas de SDS-PAGE e IEF en el equipo *PhastSystem*, escogido por su elevada sensibilidad de detección. Dado que esto fue infructuoso, se obtuvieron las propiedades desde geles bidimensionales realizados por la Profesora Andrea Mahn. Así, se estimó que el PM para TTR es de 13 KDa y el de ApoE 20 KDa, mientras que el pI de TTR se encuentra entre 5,6 a 6,0 y el pI de ApoE entre 5,0 y 5,6.

Para estimar la hidrofobicidad superficial promedio, obtenida como la contribución de todos los aminoácidos expuestos en la superficie de la proteína, se utilizaron las estructuras disponibles en bases de datos para TTR y se construyeron modelos para ApoE. Como resultado del modelamiento por homología utilizando el programa MODELLER se obtuvieron dos modelos ligeramente diferentes para la estructura tridimensional de ApoE. Ambos presentan más del 90% de los aminoácidos en las zonas permitidas del gráfico de Ramachandran, además otros parámetros evaluados también resultaron ser positivos. Así, se concluye que los modelos presentan buenas probabilidades de asemejarse a la estructura real de la proteína. Finalmente, se obtuvo que la hidrofobicidad superficial promedio para TTR es de $0,24 \pm 0,01$ y la de ApoE es de $0,33 \pm 0,02$, lo que indica que TTR es de carácter medianamente hidrofílico, mientras que ApoE es hidrofóbica.

Como proceso de purificación de TTR, se postularon dos etapas. La primera corresponde a un sistema de dos fases acuosas (ATPS) formados por PEG-1000 y Fosfato, cuyo largo de línea de equilibrio fuera de 45, y la segunda etapa corresponde a la aplicación de una muestra tomada de la fase inferior del ATPS a una resina de afinidad usando como ligado tiroxina. Como resultado, se obtuvo un ATPS capaz de remover proteínas de elevado peso molecular y parcialmente albúmina (migran preferentemente hacia la fase superior) desde muestras de suero de rata, de

manera reproducible. Se postula que TTR migra preferentemente hacia la fase inferior, sin embargo sería necesario realizar a futuro ensayos Western Blot o espectrometría de masa para comprobarlo. Con respecto a la cromatografía de afinidad realizada, tampoco es posible asegurar concluyentemente que TTR queda adsorbida o no en la matriz, sin embargo los resultados presentan algunos indicios positivos, cuyo análisis en profundidad permitiría determinar si los resultados obtenidos fueron positivos o no.

A mi tata...
Me hubiese gustado que estuvieras aquí...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mis papas por darme todo el apoyo, comprensión y cariño que me permitieron concluir exitosamente esta etapa de mi vida. Les dedico completamente el resultado de este trabajo a ellos, por su preocupación e incentivo constante. Los quiero demasiado. Gracias a mi hermano, por ser mi compañía durante 5 años y aguantarme en las buenas y en las malas.

Gracias a mis fieles amigos y compañeros de primer año, Walter, Mónica, Mariano y David, que siempre estuvieron para aconsejarme y apoyarme en los momentos difíciles. Espero que esta amistad dure por mucho tiempo. Los quiero.

De manera especial quiero agradecer a David Cerda y su familia, cuya casa fue mi segundo hogar durante la gran mayoría de mis años de estudio. Gracias por todo el cariño y preocupación que me entregaron, sin ustedes este periodo habría sido mucho menos grato.

Agradezco también a los amigos que fui encontrando a través de los años, que alegraron mis días, algunos de voleibol otros compañeros de curso, en particular a Maria Robinson, amiga y compañera de siempre, gracias por aguantarme, acompañarme y entregarme tu cariño y apoyo.

Agradezco inmensamente a mi profesora guía, Dra. María Elena Lienqueo, y a los profesores integrantes Dra. Andrea Mahn y Dr. Álvaro Oliveran por su preocupación, gran disposición, y ayuda entregada durante el desarrollo de mi trabajo.

Gracias al Dr. Juan Asenjo y todos los compañeros de trabajo que conocí en el CIByB. A Nancy por su paciencia y buenas disposición ante cualquier consulta.

Finalmente, agradezco al proyecto Fondecyt 1061154, por hacer posible el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	i
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes de las proteínas implicadas en el proyecto.....	2
1.1.1 Transtiretina.....	2
1.1.2 Apolipoproteína E.....	5
1.2 Modelamiento por homología.....	6
1.2.1 Identificación y selección del molde y alineamiento.....	7
1.2.2 Construcción del modelo.....	9
1.2.3 Evaluación del modelo.....	10
1.2.4 FUGUE.....	12
1.2.5 MODELLER.....	13
1.3 Sistema de dos fases acuosas.....	13
1.3.1 Diagrama de fases: Curva Binodal y Líneas de Equilibrio.....	14
1.3.2 Factores que alteran la migración de proteínas en ATPS.....	16
1.4 Hidrofobicidad Superficial.....	16
1.5 Antecedentes Cromatografía de afinidad.....	17
1.6 Objetivos.....	19
1.6.1 Objetivo General.....	19
1.6.2 Objetivos Específicos.....	19
1.7 Alcances.....	20
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1 Determinación de propiedades de las proteínas.....	21
2.1.1 Materiales para determinar experimentalmente PM y pI de rTTR y ApoE puras.....	21
2.1.2 Métodos para determinar experimentalmente PM y pI de rTTR y ApoE puras.....	21
2.2 Modelación por homología.....	23
2.3 Cálculo hidrofobicidad superficial.....	25
2.4 Sistema de dos fases acuosas.....	25

2.4.1	Materiales para sistemas de dos fases acuosas	25
2.4.2	Construcción de la curva binodal	25
2.4.3	Construcción de líneas de equilibrio	26
2.4.4	Construcción del sistema	27
2.4.5	Análisis por geles de acrilamida	28
2.5	Cromatografía de afinidad	28
2.5.1	Materiales para cromatografía de afinidad	28
2.5.2	Preparación de la columna	29
2.5.3	Preparación de la muestra	30
2.5.4	Condiciones de operación	31
2.5.5	Condiciones de elución	31
2.5.6	Análisis de las fracciones por geles de acrilamida SDS-PAGE	32
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1	Determinación de peso molecular (PM), punto isoeléctrico (pI) e hidrofobicidad superficial	34
3.1.1	Extracción de proteínas desde gel de acrilamida	34
3.1.2	Hidrofobicidad superficial promedio	38
3.2	Modelamiento por homología	40
3.2.1	Molde y Alineamiento	40
3.2.2	Modelos obtenidos	42
3.2.3	Refinamiento de bucles	43
3.3	Sistema de dos fases acuosas	49
3.4	Cromatografía de afinidad	56
3.4.1	Elección de la resina y condiciones de acoplamiento del ligando	56
3.4.2	Cromatografías realizadas	57
4	RECOMENDACIONES	66
5	CONCLUSIONES	67
6	BIBLIOGRAFÍA	71
	ANEXO I: Escala de hidrofobicidad de Miyazama-Jernigan	76
	ANEXO II: Pruebas de sensibilidad <i>PhastSystem</i>	77
	ANEXO III: Códigos utilizados en el modelamiento de la proteína	82
	ANEXO IV: Protocolo de utilización de GRASP	86
	ANEXO V: Protocolos estándar	88
	ANEXO VI: Curva de calibración de absorbancia a 280 nm	93
	ANEXO VII: Áreas superficiales por aminoácido para cada estructura de rTTR y ApoE	94
	ANEXO VIII: Perfiles energéticos DOPE de los modelos 22, 24 y 33	96
	ANEXO IX: Gráficos de Ramachandran para los modelos 22.17, 22.20 y 22.48	97

1 INTRODUCCIÓN

A través de los años, la percepción del rol de la nutrición en la vida de los organismos ha cambiado, ya no sólo se considera como la ingesta de nutrientes necesaria para cumplir con los requerimientos metabólicos, sino que además posee un lugar fundamental en el mejoramiento de la salud humana. Una manera de estudiar estos efectos positivos en la salud corresponde al análisis del proteoma de una célula o tejido, entendiéndose por proteoma el conjunto de proteínas expresadas por el genoma, dado que el tipo y la abundancia de las proteínas expresadas es un fiel reflejo del estado celular y de las condiciones externas a las que está sometido un organismo.

El selenio es un micronutriente esencial para animales y humanos. Su ingesta presenta variados efectos positivos para la salud, entre ellos la prevención de ciertos tipos de cáncer. Existe evidencia científica que avala el efecto positivo del selenio en la prevención de cáncer de colon (Finley y Davis, 2001; Kune y Watson, 2006), cáncer de mama (Finley y otros, 2000; Unni y otros, 2005) cáncer de pulmón (Clark y otros, 1996; Clark y otros, 1998) y cáncer de próstata (Zhuo y otros, 2004; Li y otros, 2006). Si bien se desconoce el mecanismo exacto por el cual el selenio contribuye a la prevención de estos cánceres, se postula que su efecto puede deberse a la acción preventiva contra el daño oxidativo ejercida por ciertas seleno-enzimas. Además, se ha planteado que el selenio sería de gran importancia en la síntesis de proteínas por los linfocitos T, que participarían en la erradicación de células cancerígenas (Clark y otros, 1996).

Actualmente, las investigaciones relacionadas con el selenio y su efecto quimiopreventivo se han centrado principalmente en la forma química del selenio ingerido, dadas las distintas rutas metabólicas posibles que siguen los compuestos selenados, lo que influye en su biodisponibilidad. El selenio en la naturaleza puede encontrarse formando parte de compuestos inorgánicos, como selenito y selenato de sodio, formas presentes en el agua que se ingiere, o como parte de compuestos orgánicos, principalmente selenoaminoácidos (selenometionina, selenocisteína y selenometilselenocisteína). Estos últimos disponibles en alimentos como carnes rojas, germen de trigo, brócoli y atún, entre otros. Los resultados obtenidos han demostrado que la ingesta de selenometilselenocisteína es la que presenta mayores efectos contra el cáncer (Vadhanavikit y otros, 1993).

Dados los beneficios que el selenio otorga a los organismos, se hace necesario detectar compuestos que reflejen el estado metabólico de este nutriente. Clásicamente, la biodisponibilidad de selenio ha sido determinada midiendo la concentración de saturación de selenio en los tejidos y/o la actividad de la enzima glutatión peroxidada (selenoproteína), sin embargo estudios recientes han demostrado que estas mediciones no se correlacionan con el efecto anticancerígeno del selenio, siendo sólo medidas de su ingesta y no de su estatus funcional en el organismo (Ip y otros, 2000).

En el contexto anterior, se ha desarrollado una aproximación proteómica para determinar el efecto de la suplementación de la dieta de ratas con selenometilselenocisteína como forma quimiopreventiva del selenio, con el objetivo de identificar nuevos biomarcadores indicadores de la ingesta bioactiva de selenio. Lo anterior, se encuentra enmarcado en el proyecto Fondecyt 1061154, titulado “Efecto de la suplementación dietaria con selenio orgánico sobre el proteoma sanguíneo: Identificación de nuevos bioindicadores del status metabólico del selenio”. Como resultado se han obtenido dos posibles proteínas bioindicadoras, la Transtiretina y la Apolipoproteína E. La expresión de estas proteínas en el plasma sanguíneo aumenta de manera proporcional con el aumento de la dosis de selenometilselenocisteína ingerida por el modelo animal (Mahn y otros, 2008). La caracterización y el desarrollo de un proceso de separación y purificación confiable, reproducible y económicamente accesible son los temas del presente trabajo de título.

1.1 Antecedentes de las proteínas implicadas en el proyecto

1.1.1 Transtiretina

La Transtiretina (TTR) fue identificada por primera vez en 1942 en muestras de líquido céfalo raquídeo concentrado (Kabat y otros, 1942). Dado que su movilidad electroforética es mayor que la de la albúmina, fue denominada “prealbumina”. Con el entendimiento de su función, el nombre fue alterado para representar dicha función, y se cambió por “*thyroxine-binding prealbumin*”. Sin embargo, dado esta nomenclatura es fuente de confusión ya que puede ser interpretada como que la proteína en cuestión es una forma previa de la albúmina, finalmente, se le asignó el nombre Transtiretina, reflejando su doble función transportadora (Nomenclature Committee IUB-IUPAC, 1981).

La Transtiretina de rata (rTTR) se encuentra presente en el suero y en el líquido céfalo raquídeo. La TTR plasmática es sintetizada principalmente en el hígado, presenta una concentración normal de 0,2 a 0,4 mg/mL y su tiempo de vida media es de alrededor de 2 días. Por su parte, en el sistema nervioso central, la mayor expresión de TTR se encuentra en el plexo coroideo alcanzando una concentración de 0,02 – 0,04 mg/mL en el líquido céfalo raquídeo (Cavallaro y otros, 1990; Kawaji y otros, 2005).

TTR es una proteína homotetramérica, compuesta por cuatro monómeros idénticos, cada uno conteniendo 127 aminoácidos. En el ser humano (hTTR) cada subunidad es codificada por una única copia del gen ubicada en el cromosoma 18, el cual tiene una extensión de aproximadamente 6.9 Kb. Este gen posee cuatro exones y tres intrones. El exón 1 codifica 20 aminoácidos asociados al péptido señal y los primeros tres residuos de la proteína madura. El exón 2 codifica para los residuos 4-47. El exón 3 para los residuos 48-92 y el exón 4 para los residuos 93-127. El gen que codifica para rTTR presenta un extensión similar al humano con cuatro exones a su vez y

una región codificante con cerca de un 85% de homología con la humana (Ingenblek y Young, 1994).

TTR presenta una doble función transportadora, transportando directamente tiroxina e indirectamente vitamina A (retinol) mediante el transporte de la proteína *retinol-binding protein*. En el ser humano, existen tres proteínas transportadoras de hormonas tiroideas, cada una con distinta afinidad. hTTR posee una constante de asociación (K_a) de $3.5 \times 10^7 M^{-1}$ lo que le permite transportar entre un 15% y un 20% de las hormonas disponibles (Andrea y otros, 1980). En ratas y otros vertebrados inferiores TTR es la principal proteína transportadora de hormonas tiroideas y por lo tanto presenta una mayor afinidad, reportándose una constante de asociación aparente de $K_a = 3,5 \times 10^8 M^{-1}$ (Navab y otros, 1977).

La estructura primaria del precursor no procesado de la rTTR puede encontrarse accediendo a la base de datos UniProt con el código P02767, cuyo peso molecular reportado es de aproximadamente 54.000 Da.

La estructura tridimensional de rTTR es similar a la que ha sido determinada para la hTTR, salvo pequeñas diferencias en los bucles flexibles presentes en la superficie de la proteína, que generan un mayor grado de compactación de los monómeros de rTTR. En hTTR, el 55% de los aminoácidos de cada subunidad se encuentra formando parte de dos conjuntos de ocho hojas plegadas extendidas, donde cada una comprende cuatro cadenas antiparalelas. La unión de dos subunidades involucra la interacción entre dos planos internos de las hojas beta plegadas. Finalmente, el ensamblaje de la estructura cuaternaria requiere de la formación de tres puentes de hidrógeno y la interacción de 5 residuos aminoácidos entre los bordes de las cadenas que conforman las hojas- β . Si bien esta estructura le otorga a TTR una inusitada resistencia a la denaturación, se ha reportado que si el pH es disminuido desde 7.0 a 3.9 se aprecia una clara disociación de sus subunidades (Skoulakis y Goodfellow, 2003).

La unión de las cuatro subunidades permite la formación de un canal abierto en el centro de la estructura cuaternaria donde se encuentran los dos sitios de unión para la tiroxina. Estos sitios se relacionan por cooperatividad negativa, es decir, la ocupación de un sitio genera una considerable disminución en la K_a del otro sitio. Dado esto, a concentraciones fisiológicas sólo uno se encuentra ocupado (Ferguson y otros, 1975).

El tipo de interacción involucrado en la unión de tiroxina con rTTR corresponde a los denominados enlaces halógenos. Este tipo de enlace pertenece al grupo de las interacciones de corto alcance y ocurre entre un átomo de oxígeno y un elemento halógeno, que en el caso de estudio corresponde al yodo de la tiroxina (Wojtczak y otros, 2001).

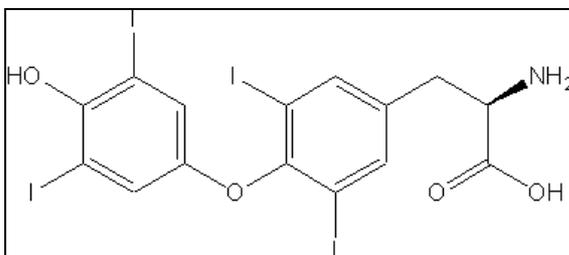


Figura 1: Estructura de la tetrayodotironina también llamada tiroxina.

El análisis cristalográfico del complejo rTTR – tiroxina entrega detalles sobre la estructura de los sitios de unión. Existen tres pares de bolsillos halógenos en cada sitio de unión para la tiroxina. El bolsillo interno está formado por las cadenas laterales alifáticas de los aminoácidos Ala 128, Leu 130, Thr 139, y Ser 137. Una de las caras de este bolsillo está formada por las cadenas principales y grupos NH de las Ala 128, Ala 129, Leu 130, Ser 137, Thr 138, y Thr 139, lo que genera una mezcla de características hidrofóbicas y polares. El bolsillo del medio formado, por las cadenas laterales de la Leu 130, Ala 139, Lys 35 y Leu 37, tiene un carácter hidrofóbico. Además, los grupos carbonilos de Ala 129, Lys 35, y Ala 128 forman una superficie hidrofílica en este bolsillo. El bolsillo exterior está formado por las cadenas laterales de Thr 126, Met 33 y Lys 35 y se encuentra separado del segundo bolsillo por las cadenas laterales de Leu 37 y Lys 3 (Wojtczak y otros, 2001).

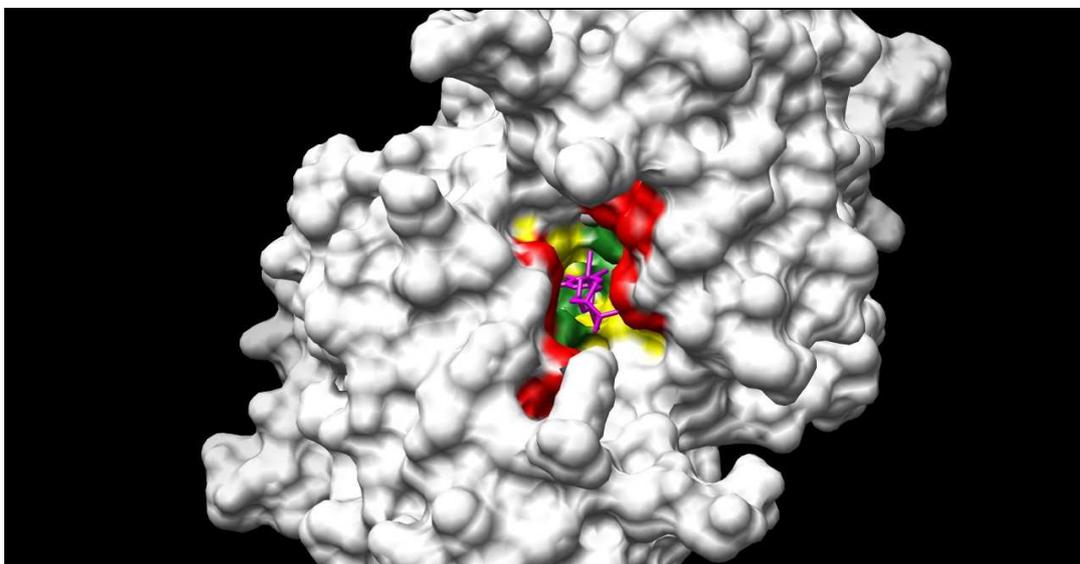


Figura 2: Estructura tridimensional de rTTR unida a tiroxina, obtenida por difracción de rayos X con una resolución de 2.5 Å. En rojo se presenta el bolsillo de unión halógeno más externo, en amarillo el bolsillo medio y en verde el bolsillo interno. En magenta se aprecia el ligando, tiroxina.

TTR es uno de los más comunes indicadores bioquímicos de la disminución del nivel de proteínas, por lo que su aislamiento y purificación ha sido muy necesaria. Los procedimientos que se utilizan con dicho fin van desde protocolos de purificación que incluyen una serie de pasos cromatográficos hasta procesos de un solo paso, en el que se realiza una cromatografía de afinidad utilizando como ligando la proteína RBP (Larsson y otros, 1985).

Finalmente, cabe mencionar que la construcción de modelos sobre la expresión de TTR en ratas ha servido para entregar información valiosa en las investigaciones nutricionales, sin embargo estos resultados deben ser extrapolados con cautela hacia el ser humano, ya que el rol biológico que juega la TTR en ratas es mucho más importante (Savu y otros, 1987).

1.1.2 Apolipoproteína E

La Apolipoproteína E es una proteína plasmática que, como su nombre lo indica, pertenece al grupo de las lipoproteínas. Las lipoproteínas son complejos no covalentes, esféricos que consisten en un núcleo lipídico compuesto por triglicéridos y colesterol rodeado por fosfolípidos solubles en agua y apolipoproteínas. Su función es el transporte de lípidos a través del torrente sanguíneo para proveer material base para la síntesis de esteroides, ensamblaje de membrana celular, y energía metabólica. Existen 6 tipos básicos de lipoproteínas: quilomicrones, quilomicrones remanentes, productos de la acción de la lipasa de lipoproteínas sobre los quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Mientras más alta la razón (lípidos/proteína) en la partícula, más baja es la densidad (Mahley y otros, 1984).

Las proteínas que rodean el núcleo lipídico se denominan apolipoproteínas o simplemente apoproteínas. En humanos, los distintos tipos son designados por las letras A, B, C, D y E. Su tamaño es variable, pero su estructura general es altamente conservada y consiste en repeticiones en *tandem* de α hélices, de aproximadamente 25 residuos aminoácidos cada uno, separadas por cortos bucles al azar. En la mayoría de las apolipoproteínas, la cara hidrofílica de una hélice también contiene un parche de residuos cargados cuya función en la superficie celular es ser receptor de unión y participar del proceso de endocitosis. Estas hélices se designan hélices receptoras de unión.

La Apolipoproteína E (Apo E) de rata es una proteína monomérica de 294 aminoácidos (PM 34.000 Da aprox.) que se encuentra como componente de la superficie de quilomicrones, VLDL y un subconjunto de HDL. Se sintetiza principalmente en el hígado, sin embargo es posible encontrar su transcrito en variados tejidos periféricos del organismo. Su secuencia aminoacídica puede ser obtenida ingresando en la base de datos UniProt con el código P02650.

La estructura tridimensional de la Apo E humana ha sido obtenida por difracción de rayos X. En estos modelos, las cuatro alfa hélices de la estructura se encuentran formando un paquete (agrupadas). Esto no necesariamente coincide con la conformación real adoptada en las lipoproteínas, ya que existe la posibilidad de que ocurran interacciones entre las caras hidrofóbicas de las hélices y el núcleo lipídico, generando una conformación extendida sobre la superficie de este último. Por su parte, la estructura cuaternaria de la Apo E de rata no ha sido obtenida por cristalografía, y sólo se dispone de un fragmento modelado por homología (SwissModel Repository, código P02650).

Las funciones de ApoE son bastante conservadas entre las distintas especies. Dentro de ellas se encuentran: actuar como ligando para los receptores de LDL presentes en otras lipoproteínas, participar en el transporte reverso y en el metabolismo del colesterol y otros lípidos hacia y desde las células, y como agente inmunorregulatorio y regulador del crecimiento celular (Mahley y otros, 1984).

1.2 Modelamiento por homología.

El modelamiento por homología es una metodología que permite construir un modelo útil de la estructura tridimensional de una proteína cuya estructura real es desconocida. Se necesita conocer su secuencia aminoacídica y la estructura tridimensional de una proteína homóloga, evolutivamente relacionada, obtenida por difracción de rayos X o por resonancia magnética nuclear (NMR).

Se basa principalmente, en dos observaciones:

- La estructura de una proteína se encuentra únicamente determinada por su secuencia de aminoácidos, es decir, conocer la secuencia de una proteína debería ser suficiente, en teoría, para obtener su estructura (Epstain y otros, 1963).
- Durante la evolución, la estructura tridimensional es más estable y cambia mucho más lentamente que la secuencia de aminoácidos asociada. Así, secuencias similares poseen estructuras prácticamente idénticas e incluso proteínas lejanamente relacionadas presentan plegamientos similares. Esta relación fue identificada por Chothia y Lesk en 1986 y posteriormente cuantificada por Sander y Shneider en 1991. En 1999, gracias al gran crecimiento de las bases de datos que almacenan secuencias, Rost fue capaz de derivar un límite preciso de esta tendencia, en función del número de aminoácidos alineados y el porcentaje de identidad de secuencia.

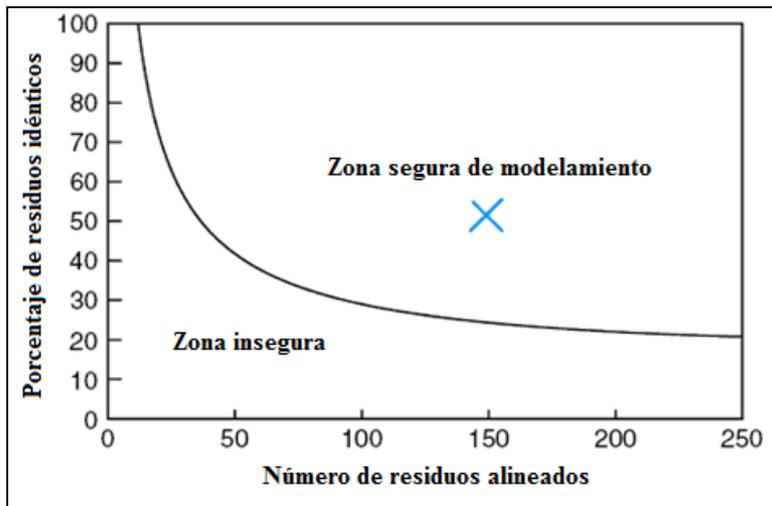


Figura 3: Gráfico de Lesk. Si el par largo y el porcentaje de identidad de dos secuencias se ubica dentro de la zona marcada como segura, es prácticamente una certeza que las dos secuencias poseerán el mismo plegamiento (Rost, 1999)

El modelamiento por homología es un proceso multietapas, las cuales pueden resumirse en los siguientes cuatro pasos.

- Búsqueda y selección del molde.
- Construcción del alineamiento secuencia blanco-templado.
- Construcción del modelo: incluye la generación del esqueleto de la proteína, y el modelamiento de bucles y cadenas laterales.
- Evaluación del modelo.

1.2.1 Identificación y selección del molde y alineamiento.

La selección del mejor molde se encuentra íntimamente relacionada con la construcción del alineamiento blanco-molde, ya que su identificación radica en la producción de alineamientos de secuencia. Este es un paso trascendental dentro del modelamiento por homología, ya que la calidad del modelo a obtener depende en gran medida de la calidad del alineamiento seleccionado.

Existen diversas metodologías para la identificación de los posibles moldes, que pueden ser divididas en tres clases. La primera clase incluye los métodos que comparan la secuencia blanco

con cada secuencia disponible en la base de datos independientemente, es decir, por pares y que sólo consideran información proveniente de la secuencia. A este tipo pertenecen programas como FASTA y BLAST.

El segundo conjunto de métodos se basa en la comparación de múltiples secuencias, lo que aumenta la sensibilidad del método de búsqueda. Un ejemplo de este tipo es PSI-BLAST, en el cual se determina un primer conjunto de homólogos, se construyen los alineamientos múltiples entre el blanco y sus homólogos entregando una matriz de puntajes que se utiliza para la búsqueda de nuevos homólogos. Esto se realiza iterativamente hasta que no se encuentran más homólogos.

El tercer conjunto de métodos se denominan “de enhebrado” o “métodos de encaje con moldes tridimensionales”. Se basan en la comparación de a pares entre la secuencia blanco y una proteína con estructura conocida. Para predecir si la secuencia blanco adoptará o no la estructura tridimensional de alguna proteína conocida se realiza una optimización del alineamiento con respecto a una función de puntaje cuyo valor depende de la estructura. Esto se realiza de manera independiente para cada par blanco-molde. Estos métodos son muy útiles cuando no se dispone de secuencias claramente relacionadas con la proteína a modelar. Dentro de este tipo de métodos se encuentra el programa FUGUE.

Para seleccionar el molde más adecuado para la construcción de un modelo existen diversas consideraciones dependiendo del objetivo para el cual la proteína está siendo modelada. Sin embargo, existen ciertos criterios generales que se deben seguir.

- A mayor similitud de secuencia con la proteína blanco, mejor el molde.
- Mientras más próximo, evolutivamente hablando, se encuentre la proteína molde de la proteína blanco, mejor es.
- Se deben comparar los ambientes en los que el molde y la proteína blanco adquieren su estructura cuaternaria. Se consideran factores como solvente, pH, ligandos y otras interacciones cuaternarias.
- Se debe considerar la calidad de la estructura tridimensional disponible para el molde, por ejemplo, analizando el factor R si la estructura fue obtenida por cristalografía o el número de restricciones por residuo si la estructura fue obtenida por resonancia magnética nuclear (NMR).

Una vez escogido el molde, se procede con la construcción del alineamiento. Algunas recomendaciones para la construcción del alineamiento son:

- Si existe un porcentaje de identidad de secuencia entre la proteína blanco y el molde es superior al 40%, puede aceptarse como válidos los alineamientos construidos por los programas de búsqueda de moldes.
- Al disminuir el porcentaje de identidad, aumenta el número de *gaps* (porciones donde la secuencia blanco no se alinea con el templado), lo que hace necesario la utilización de programas como CLUSTAL, que corrigen automáticamente los alineamientos.
- En los casos de modelamiento más difíciles, es preferible construir modelos desde los posibles moldes y evaluar la calidad del molde seleccionado en base a la evaluación del modelo obtenido. Esto se debe a que, en general, los programas de evaluación de modelos son mucho más precisos que los que evalúan moldes (Martí-Renom y otros, 2006).

1.2.2 Construcción del modelo

Al igual que para la selección del molde, existen tres tipos de metodologías para la construcción modelos a partir de un alineamiento. El original y aún ampliamente utilizado es el modelamiento por ensamblaje de cuerpos rígidos (*Modeling by assembly of rigid bodies*). Este método construye el modelo a partir de un pequeño número de cuerpos rígidos (zonas cuyas coordenadas relativas entre sí se mantienen fijas al ser sometido a fuerzas externas) obtenidos desde la estructura de la proteína alineada. Esta aproximación se basa en que el plegamiento de las proteínas puede dividirse en regiones núcleo que se conservan, bucles variables y cadenas laterales (Martí-Renom y otros, 2006).

El segundo tipo de metodologías disponibles para la construcción de modelos por homología se denomina “Modelamiento por igualamiento de segmentos o Reconstrucción de coordenadas” (*Modeling by segment matching or coordinate reconstruction*). Se basa en que la mayoría de los segmentos formados por seis péptidos de la estructura de las proteínas pueden ser agrupados en aproximadamente 100 clases estructurales. Así los modelos por homología se construyen ensamblando segmentos cortos que siguen como guía a un subconjunto de posiciones atómicas, obtenidas desde la estructura templado. Usualmente los carbonos alfa del esqueleto de la proteína son utilizados como guía (Martí-Renom y otros, 2006).

La tercera clase de metodologías se denomina “Modelamiento por satisfacción de las restricciones espaciales” (*Modeling by satisfaction of spatial restraints*). Estos métodos generan una serie de restricciones o limitaciones sobre la estructura que puede adoptar la secuencia blanco asumiendo que los ángulos y largos de enlace deben ser similares a los que poseen los residuos alineados con el templado. Las restricciones son de tipo estereoquímicas y se aplican sobre largo de enlaces, ángulos de enlace, ángulos dihedrales y contactos entre átomos no unidos. El modelo se obtiene mediante la minimización de las infracciones a estas restricciones (Martí-Renom y otros, 2006).

Este último conjunto de métodos de modelación es el que presenta mayores posibilidades de generar un modelo adecuado entre todas las técnicas nombradas, ya que utiliza muchos tipos de información sobre la secuencia blanco y presenta la posibilidad de incorporar restricciones obtenidas por métodos independientes. El programa MODELLER pertenece a este tipo de metodología.

Todos los métodos anteriores se refieren principalmente a la modelación de la estructura de la cadena principal de una proteína. Sin embargo, existen otras zonas que deben ser consideradas y que presentan mayores dificultades al momento de modelar, como son los bucles, que unen estructuras secundarias, y las cadenas laterales (Martí-Renom y otros, 2006).

Los bucles usualmente determinan la funcionalidad específica de una proteína, por lo que resultan de trascendental importancia cuando el modelo a construir va a ser utilizado en el estudio de interacciones ligando-proteína. La principal limitante del modelamiento de bucles radica en que su conformación tridimensional debe obtenerse, en gran parte, sólo con la información obtenida desde su propia secuencia y dado que en general son muy cortos, ésta suele ser insuficiente para asegurar que la conformación obtenida es la real. Desafortunadamente, no se encuentran disponibles métodos confiables para la modelación de bucles de más de 5 residuos de largo, aunque actualmente ha habido ciertos progresos sobre este tema (Fiser y otros, 2000).

1.2.3 Evaluación del modelo

A medida que la similitud entre la secuencia blanco y el molde disminuye, los errores en el modelo aumentan. Los errores de un modelo pueden ser divididos en cinco categorías:

- Errores en el empaquetamiento de las cadenas laterales. Críticos cuando ocurren en regiones involucradas en la funcionalidad de la proteína.
- Distorsiones y cambios en regiones correctamente alineadas. Como consecuencia de las diferencias en secuencia, la conformación de la cadena lateral cambia,

aunque el plegamiento global siga siendo el mismo. Así es posible que en regiones correctamente alineadas, el molde sea localmente diferente del blanco lo que resulta en errores en esta región. Algunas veces estas diferencias no se deben a diferencias en secuencia sino a vestigios de las técnicas utilizadas para la determinación de la estructura molde. Esto se puede minimizar utilizando múltiples moldes.

- Errores en regiones sin molde (inserciones, deleciones o bucles).
- Errores debido a malos alineamientos. Es la fuente más importante de errores, especialmente cuando la identidad de secuencia es menor que el 30%. Estos errores pueden ser minimizados ya sea utilizando alineamientos múltiples o modificando iterativamente las regiones del alineamiento que presentan los problemas en el modelo.
- Molde incorrecto. Este problema surge cuando se utilizan como molde proteínas distantes (menos de un 25% de identidad de secuencia).

Todos estos tipos de errores hacen necesaria la evaluación del modelo antes de extraer cualquier tipo de información de él. Existen muchos servidores y programas disponibles para la evaluación de modelos.

El primer paso en la evaluación de un modelo es asegurarse que presente el plegamiento correcto. Su exactitud puede ser estimada en base a: una alta similitud con el molde más cercano, a su potencial DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) (Shen y Sali, 2006) o por la conservación de residuos claves en la secuencia blanco. Además, un requerimiento básico de un buen modelo es que posea buena estereoquímica. Programas útiles para evaluar la estereoquímica de un modelo son:

- PROCHECK, (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html>)
- AQUA, (<http://tang.bmr.b.wisc.edu/~jurgan/aqua/>)
- WHATCHECK, (<http://www.cmbi.kun.nl/whatif/whatcheck/>)
- SQUID.

Las características analizadas por estos programas incluyen largos y ángulos de enlace, planaridad del enlace peptídico y de los anillos presentes en las cadenas laterales, quiralidad, ángulos de torsión de la cadena principal y de las cadenas laterales, y conflictos entre pares de átomos no unidos.

Otros criterios que pueden considerarse para la evaluación de un modelo corresponden a la distribución de características espaciales como: formación del núcleo hidrofóbico, accesibilidad al solvente de residuos y átomos, distribución espacial de grupos cargados, distribución de las distancias átomo-átomo, volúmenes atómicos, y enlaces de hidrógeno en la cadena principal. Comparando los valores obtenidos del modelo para estas propiedades con los valores obtenidos para estructuras de proteínas obtenidas con altas resoluciones, se puede tener una idea de si el modelo es correcto o no, dado que no se esperan grandes desviaciones en estos valores para todas las proteínas (Martí-Renom y otros, 2006).

1.2.4 FUGUE

FUGUE es un programa computacional que permite reconocer homólogos distantes por comparación entre secuencia y estructura. El algoritmo de reconocimiento utilizado consta de tres pasos. El primero consiste en la construcción de tablas de sustitución de aminoácidos ambiente específicas usando como base alineamientos estructurales de proteínas homólogas. Las tablas de sustitución se basan en el hecho que cada aminoácido inserto en una estructura terciaria se encuentra ubicado en un ambiente específico, que puede ser descrito en base a propiedades como la conformación de la cadena principal, accesibilidad al solvente y el nivel de enlaces de hidrógeno. Se ha demostrado que la sustitución de un aminoácido es regida por el ambiente en el que se encuentra y que cada ambiente tiene un patrón de sustitución distinto. Así, la probabilidad de que una determinada sustitución ocurra en un determinado ambiente es obtenida a partir del análisis de alineamientos estructurales de proteínas homólogas disponibles en la base de datos HOMSTRAD y registrada en las tablas de sustitución ambiente-específicas.

El segundo paso consiste en la generación de una base de datos de perfiles estructurales de las estructuras individuales o alineamientos estructurales usando las tablas de sustitución ambiente-específicas y penalizando las ausencias de alineamiento. Cada perfil estructural consiste en dos matrices, una matriz de puntajes y una matriz de penalidades por *gaps* (deleciones o inserciones) en el alineamiento.

El último paso corresponde a la alineación de la secuencia blanco contra cada perfil disponible en la base de datos generada. Para cada comparación se evalúa la significancia estadística, representada por el *z-score* (número de desviaciones estándar obtenidas por sobre el promedio), que ayuda a la evaluación de las compatibilidades secuencia-estructura y las posibles relaciones evolutivas (Shi J., y otros, 2001).

1.2.5 MODELLER

MODELLER (<http://www.salilab.org/modeller/>) es una herramienta computacional desarrollada por el científico Andrej Sali, que se utiliza para el modelamiento de estructuras tridimensionales por homología. Este programa utiliza como información de entrada el alineamiento entre la secuencia blanco y una o varias estructuras tridimensionales de proteínas homólogas.

Como ya fue mencionado, este programa construye un modelo tridimensional en base a la satisfacción de restricciones espaciales. La forma de estas restricciones es obtenida a partir del análisis estadístico de muchos pares de estructuras homólogas que forman una base de datos de 105 familias, incluyendo 416 proteínas con estructura tridimensional conocida. Así se determinaron correlaciones entre distintas propiedades estructurales en dos proteínas relacionadas, como por ejemplo largos de enlace entre los carbonos alpha de la cadena, ángulos dihedrales, etc. Todas las restricciones se expresan como funciones de probabilidad, las que luego se combinan con términos energéticos obtenidos por el programa CHARMM para obtener la función objetivo. Finalmente, el programa realiza una optimización de la función objetivo en el espacio cartesiano utilizando un método que incluye técnicas de gradiente conjugado y de dinámica molecular. Variando la estructura inicial, se pueden obtener muchos modelos ligeramente diferentes, que pueden ser utilizados para estimar errores en ciertas regiones del plegamiento.

Para el modelamiento de bucles, MODELLER posee variados métodos de optimización basado en funciones de puntuación y otros protocolos de optimización. El proceso considera como primera etapa la selección de todos los residuos estándar ubicados en las cercanías de los *gaps* presentes en el alineamiento. Luego genera una conformación inicial simplemente ubicando los átomos, uniformemente espaciados en la línea que conecta los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de la cadena principal y los átomos de nitrógeno del grupo amida, de los extremos carboxilo y amino terminal respectivamente. A continuación genera una serie de modelos cuya conformación varía al azar en $\pm 5\text{\AA}$ en cada una de las direcciones cartesianas. Finalmente se realiza la optimización de los bucles, que se basa en una función potencial de la fuerza promedio de las interacciones dependientes de la distancia entre átomos, que no correspondan a interacciones de unión.

1.3 Sistema de dos fases acuosas

Los sistemas de dos fases acuosas son sistemas de extracción líquido – líquido que se forman al mezclar un polímero (polietilenglicol PEG) y un soluto de bajo peso molecular (otro polímero o una sal) solubles en agua, en concentraciones adecuadas en una solución acuosa. Esto origina la formación de dos fases homogéneas, inmiscibles. Los sistemas comúnmente más usados son los compuestos por PEG y dextrano y por PEG y sales fosfatadas. A diferencia de otros sistemas de

extracción que utilizan solventes orgánicos, el elevado contenido de agua de estos sistemas otorga un ambiente físicoquímico adecuado para las partículas biológicas, por lo que han sido muy utilizados en la separación de diversas materias biológicas como proteínas, células, organelos, virus, entre otras (Albertsson, 1986).

Se ha reportado que el uso de un sistema de dos fases acuosas compuesto por PEG-1000 y fosfato perteneciente a línea de equilibrio de largo 45 con muestras de suero de rata, permite la separación de proteínas séricas presentes en concentraciones trazas. Se postula que las proteínas abundantes del plasma migran indiferenciadamente ya sea a la fase superior o a la fase inferior, mientras que las proteínas presentes en baja concentración permanecen en la interfase (Benavides y otros, 2007)

Algunas de las principales ventajas de este método de separación, se presentan a continuación:

- Escalamiento simple y confiable.
- Rápida transferencia de masa, por lo que alcanzan puntos cercanos al equilibrio en poco tiempo.
- Estabilización de ciertos componentes biológicos.
- Sistema selectivo.
- Bajos costos de operación y de las materias primas necesarias.

1.3.1 Diagrama de fases: Curva Binodal y Líneas de Equilibrio.

Cada sistema de dos fases acuosas realizado a cierta temperatura y pH se puede representar por un único diagrama de fases formado por las composiciones de equilibrio. Estas composiciones críticas se representan en una curva llamada curva binodal, que divide en dos zonas el diagrama de fases. La mezcla de soluciones con composiciones ubicadas por sobre la curva binodal entrega sistemas compuestos por dos fases inmiscibles, y por el contrario los pares de concentraciones ubicados bajo la curva, sistemas de sólo una fase.

Existen distintos pares de concentraciones que entregan sistemas de dos fases en los cuales la composición de la fase superior de un sistema es la misma que la composición de la fase superior del otro sistema. Lo mismo ocurre con las composiciones de las fases inferiores. La única

diferencia que existe entre ellos es la razón entre las masas de las fases. En el diagrama de fases estos sistemas se presentan en la línea de equilibrio o *tie line* (Diamond y Hsu, 1992).

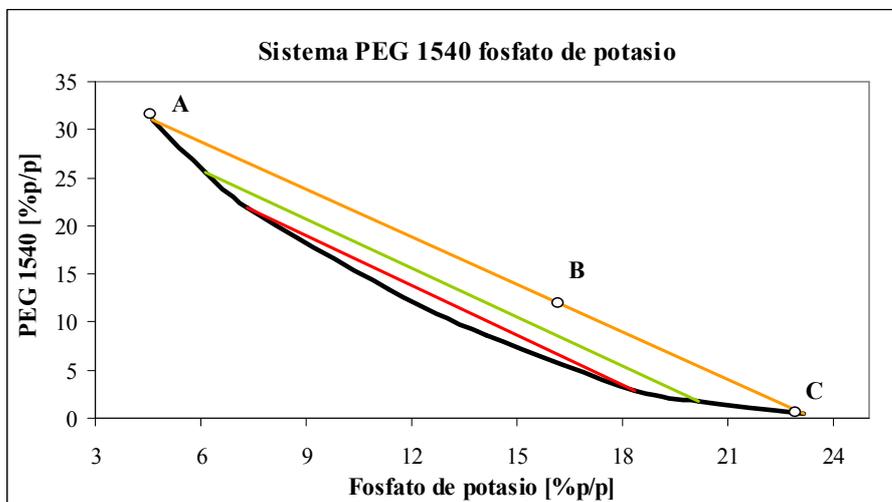


Figura 4: Diagrama de fases y líneas de equilibrio para el sistema PEG 1540 - Fosfato de Potasio. En negro, se presenta la curva binodal del sistema limitando las zonas de formación de dos fases. En colores se presentan algunas de las líneas de equilibrio.

La razón entre la masa de la fase superior y la masa de la fase inferior se obtiene a partir de la regla de fases inversa. Así, si W^{sup} corresponde al porcentaje en peso de la fase superior y W^{inf} al porcentaje en peso de la fase inferior, se tiene:

Ecuación 1

$$\frac{W^{\text{sup}}}{W^{\text{inf}}} = \frac{\overline{BC}}{\overline{AB}}$$

Si se conoce la densidad de cada una de las fases, la relación anterior puede expresarse en función del volumen y la densidad de cada fase. Además, dado que en general la densidad de las fases es bastante similares se obtiene:

Ecuación 2

$$\frac{V^{\text{sup}}}{V^{\text{inf}}} = \frac{\overline{BC}}{\overline{AB}} = R_v$$

Donde R_v corresponde a la razón volumétrica. Éste es un parámetro muy importante en el diseño del proceso de separación, ya que su variación puede aumentar o disminuir el rendimiento, en un componente específico, para sistemas que se encuentran en la misma línea de equilibrio.

1.3.2 Factores que alteran la migración de proteínas en ATPS

En los sistemas ATPS, muestras orgánicas como proteínas y biopolímeros pueden migrar hacia una u otra fase en función de sus propiedades, permitiendo la separación y purificación del compuesto de interés. Esta migración corresponde a un fenómeno dependiente de propiedades superficiales.

La eficiencia de migración selectiva de una muestra de proteínas en un sistema de dos fases acuosas, está representada por el coeficiente de partición (K) el que se define como la razón entre la concentración de proteína en la fase superior y la fase inferior.

Este coeficiente se ve afectado por distintos factores, que pueden ser divididos en dos grupos. El primer grupo de parámetros que afectan K corresponde a propiedades intrínsecas de las proteínas, como son su peso molecular, carga, conformación tridimensional, e hidrofobicidad superficial, entre otros. El segundo grupo, corresponde a propiedades del sistema en el que se está llevando a cabo la separación, como la presencia o ausencia de sal, pH, peso molecular, y concentración de los solutos utilizados.

Así si bien, el coeficiente de partición es muy parámetro importante de conocer, no se encontró durante la búsqueda bibliográfica correlaciones o modelos capaces de entregar este parámetro, para el sistema de separación a utilizar.

1.4 Hidrofobicidad Superficial

La hidrofobicidad superficial es una propiedad de las proteínas de especial relevancia en el diseño de procesos de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y de separación de proteínas utilizando ATPS, ya que en ambos ocurren fenómenos de interacción hidrofóbica a nivel superficial. Existen diferentes metodologías para el cálculo de la hidrofobicidad superficial, una de ellas es el cálculo de la hidrofobicidad promedio (HSP). Se ha sugerido el uso de HSP, para la predicción del tiempo de retención de proteínas en HIC (Lienqueo y otros, 2002). Dado lo anterior, se estima que dicho parámetro puede ser representativo del comportamiento de una proteína en un ATPS.

La hidrofobicidad superficial promedio puede ser estimada a partir de la estructura tridimensional de la proteína tomando en cuenta la contribución de los residuos aminoacídicos expuestos en su superficie. La relación utilizada es la siguiente:

Ecuación 3

$$\phi_{promedio} = \sum (\phi_{aai} \cdot r_{aai})$$

donde $\phi_{promedio}$ es el valor de HSP calculado para una proteína dada, ϕ_{aai} es el valor de hidrofobicidad asignado al aminoácido “i”. Existen más de 40 escalas de hidrofobicidad propuestas para los aminoácidos, sin embargo, se ha postulado que el uso de la escala de Miyazawa-Jernigan, disponible en Anexo I, (Miyazawa y Jernigan, 1985) para determinar la hidrofobicidad superficial promedio, es la que presenta una mejor correlación para la determinación del tiempo de retención en HIC (Lienqueo y otros 2002). Finalmente, r_{aai} corresponde al área superficial relativa expuesta para cada aminoácido “i” y se define como:

Ecuación 4

$$r_{aai} = \frac{s_{aai}}{\sum s_{aai}}$$

donde s_{aai} es el área total expuesta del residuo “i” en la proteína y $\sum s_{aai}$ es la superficie total de la proteína.

1.5 Antecedentes Cromatografía de afinidad.

La cromatografía de afinidad es un proceso de separación y purificación de proteínas que se basa en la interacción reversible entre la proteína (o un grupo de proteínas) y un ligando específico que se encuentra acoplado a la matriz cromatográfica. Sus principales ventajas son su elevada selectividad, alta resolución, y generalmente una elevada capacidad. Algunas aplicaciones incluyen la separación de moléculas denaturadas o inactivas de las funcionalmente activas, separación de proteínas presentes en grandes volúmenes a bajas concentraciones o para la remoción de contaminantes específicos.

La solución que contiene la macromolécula de interés es pasada a través de una columna que contiene un polímero insoluble o gel al cual se le ha unido covalentemente el ligando. Las proteínas que no presentan afinidad por el ligando, pasarán sin retardo a través de la columna, mientras que aquellas que reconocen el ligando se demorarán más en pasar, en forma proporcional a la afinidad que presente la proteína por el ligando bajo las condiciones experimentales. Las interacciones entre la molécula blanco y el ligando pueden ser el resultado de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals y/o puentes de hidrógeno, entre otras. Finalmente, la elución de la proteína de interés desde la matriz, se lleva a cabo ya sea mediante la aplicación de condiciones que alteren el medio, lo que influencia las distintas fuerzas participantes (gradientes de pH lineales o escalonados, gradientes de sal, reducción de la polaridad del medio); mediante la alteración de la estructura funcional de la proteína (variación de pH, agentes caotrópicos denaturantes) o mediante la elución competitiva al agregar un componente con mayor afinidad por el ligando que la proteína blanco.

En el caso de la proteína Transtiretina, existe la posibilidad de realizar una cromatografía de afinidad utilizando como ligando la proteína *retinol-binding protein* (RBP) o la hormona L-tiroxina. Se ha reportado la utilización de RBP como ligando para purificar Transtiretina humana, canina (Goran y otros, 1977) y de cerdo (Duan y otros, 1995), además del uso de Transtiretina como ligando inmovilizado para la purificación de RBP humana (Vahlquist y otros, 1971). Intentos más recientes han utilizado la cromatografía de afinidad con tiroxina unida a una resina macroporosa con un tamaño de partícula promedio de 10 μm , como uno de los pasos para la purificación parcial de Transtiretina humana (Lu y otros, 1996).

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo General

Determinar las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las proteínas Transtiretina y Apolipoproteína E, indicadores del estado funcional del selenio, de potencial aplicación biomédica y desarrollar un método preliminar de purificación para una de ellas.

1.6.2 Objetivos Específicos

- 1.- Estimar la estructura tridimensional de las proteínas Apolipoproteína E y Transtiretina.

- 2.- Determinar propiedades fisicoquímicas de las proteínas Apolipoproteína E y Transtiretina, como peso molecular (PM), punto isoelectrico (pI) e hidrofobicidad superficial de las proteínas de interés.

- 3.- Estudiar un proceso de purificación preliminar para la proteína plasmática Transtiretina formado por dos etapas: sistema de dos fases acuosas y cromatografía de afinidad.

1.7 Alcances

En el presente trabajo de título se pretende estimar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas Transtiretina y Apolipoproteína E. Dentro de ellas se cuentan el peso molecular (PM), punto isoeléctrico (PI) e hidrofobicidad superficial promedio. Dado que la hidrofobicidad superficial promedio es una propiedad que depende de la estructura tridimensional de la proteína, los valores entregados consideran cierto error asociado a las diferentes estructuras disponibles.

Dado que en el caso de la Apolipoproteína E no se dispone de una estructura tridimensional obtenida por difracción de rayos X o resonancia magnética nuclear, se consideró la construcción de un modelo por homología. El grado de precisión del modelo sólo es suficiente para obtener la propiedad de interés, así si el modelo se quiere utilizar para otros fines, no se asegura la exactitud de la información extraída desde el mismo.

Se considera el estudio de un posible proceso de purificación para Transtiretina a partir de muestras de plasma obtenidas de ratas cuya dieta fue suplementada con selenometilselenocisteína. El proceso considera dos etapas, la primera corresponde a un sistema de dos fases acuosas donde se pretende disminuir la presencia de proteínas abundantes en el plasma, como albúmina e inmunoglobulinas. La segunda etapa corresponde a una cromatografía de afinidad utilizando como ligando moléculas de tiroxina.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Determinación de propiedades de las proteínas.

2.1.1 Materiales para determinar experimentalmente PM y pI de rTTR y ApoE puras.

Reactivos

- Tris Base, $C_4H_{11}NO_3$ Biología molecular. (Winkler)
- Ácido Clorhídrico fumante 37%, HCl (Merck).
- Cloruro de Sodio, NaCl Grado analítico. (Merck)
- Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA) $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$. (Merck)
- Ácido Fórmico 88%, CH_2O_2 . (J. T. Baker)
- 2-Propanol, $CH_3CH(OH)CH_3$ Grado analítico. (Merck)
- Dodecilsulfato de Sodio (SDS), $NaC_{12}H_{25}SO_4$, Biología molecular. (Winkler)
- 2-mercaptoetanol, Grado Analítico. (Merck)
- Azul de bromofenol (PlusOne)
- Albumina de suero bovina (BSA). (Sigma)
- Agua Milli-Q

Soluciones

- **Buffer A:** 50 mM de Tris, 150 mM de Cloruro de Sodio, 0.1 mM de EDTA. pH 7,5 ajustado con Ácido Clorhídrico.
- **Buffer B:** 10 mM de Tris, 1mM de EDTA, pH 8,0 ajustado con Ácido Clorhídrico.
- **Solución C:** 16,7% v/v de Ácido Fórmico, 50% v/v de agua mili-Q, 33.3% v/v de 2-Propanol.
- **Buffer de carga 5X:** 12,5 % p/v SDS, 25% p/v de 2-mercaptoetanol, 0,05% p/v de azul del bromofenol.

2.1.2 Métodos para determinar experimentalmente PM y pI de rTTR y ApoE puras.

Extracción de proteínas desde geles de acrilamida.

La muestra a tratar fue entregada por la Profesora Andrea Mahn y corresponde a pequeños trozos de geles de acrilamida que contienen las bandas de cada una de las proteínas de interés (determinado por espectrometría de masa).

Se utilizaron dos técnicas para eluir las proteínas de interés desde la muestra entregada.

Para el desarrollo de la primera técnica se coloca el trozo de gel en un tubo eppendorf de 1.5 mL al que se le agrega el volumen suficiente de buffer A para cubrir todo el trozo, en este caso se agregaron 200 μ L. Luego el trozo se muele con una espátula limpia dentro del tubo. El tubo es incubado por 24 horas, bajo agitación a 30° C (Thermomixer Comfort Eppendorf de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Al día siguiente, se centrifuga a 10.000 x \bar{g} por 10 minutos (Centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), recuperando el sobrenadante cuidadosamente usando una pipeta. El sobrenadante se almacena en un tubo limpio (Steven Cohen y otros, 1997).

Para determinar la concentración de proteína en el sobrenadante se realizan mediciones de absorbancia a 280 nm en cubetas de cuarzo (Espectrofotómetro UltroSpec 3000, Pharmacia Biotech, Dinamarca). Para transformar los datos de absorbancia a concentración se construye una curva de calibración utilizando muestras de albúmina bovina (BSA) de concentración conocida.

La segunda técnica utilizada consiste en colocar el trozo de gel en un tubo eppendorf de 0,6 mL, donde se muele hasta que quede en trozos lo más pequeños posible. Luego se le agrega 40 μ L de buffer C, cubriendo completamente los trozos. El tubo se agita vigorosamente (800 rpm) por 8 horas a temperatura ambiente (Thermomixer Comfort Eppendorf de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). A continuación, el tubo se centrifuga a 10.000 x \bar{g} (Centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y se colecta el sobrenadante. Los trozos de gel que permanecen en el *pellet* se lavan con 40 μ L de buffer C, se vuelven a centrifugar y el sobrenadante se colecta y mezcla con el sobrenadante obtenido en el primer paso de extracción. Las muestras obtenidas mediante este procedimiento fueron liofilizadas (Liofilizador ThermoSavant Micro Modulyo), pero luego se debió resuspender, por lo que se recomienda que sean cargadas directamente en el gel (Technical Resource, Pierce).

Análisis por geles de acrilamida en equipo PhastSystem.

Se realizaron geles de acrilamida, tanto SDS-PAGE (*PhastGel* con gradiente 8-25) como de isoelectroenfoque (*PhastGel IEF*, pH 3-9), los cuales fueron teñidos con nitrato de plata.

Se cargaron 8 μ L de cada una de las muestras de las proteínas de interés, obtenidas por el primer método de extracción, en el gel IEF. Además como control, se cargaron dos muestras de BSA con concentraciones conocidas. Se utilizaron dos peinetas de con 6 pocillos de 4 μ L cada uno.

Las muestras obtenidas por la segunda técnica de extracción fueron cargadas en gel para SDS-PAGE. Para esto, las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en 20 μ L de buffer B. Dadas las dificultades presentadas, la muestra se incubó por 1 hora a 30° C bajo agitación intensa (Thermomixer Comfort, Eppendorff de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Luego se

centrifugó a 10.000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) por 1 minuto y se tomaron 6 μ L del sobrenadante que fue mezclado con 1,5 μ L de buffer de carga. Los 7,5 μ L así obtenidos se cargaron al gel de acrilamida.

Además, para analizar la sensibilidad de los métodos, se realizaron pruebas con soluciones de BSA de concentración conocida y sometidas a los mismos procedimientos que las muestras que se cargaron en cada gel. La metodología llevada a cabo para los análisis de la sensibilidad de los métodos se detalla en el Anexo II.

Los procedimientos seguidos para efectuar la electroforesis y el isoelectroenfoco corresponden a la metodología estándar descrita en los documentos técnicos del equipo *PhastSystem* (Technical Resources, Pharmacia).

2.2 Modelación por homología

El primer paso para el modelamiento por homología de la proteína Apolipoproteína E corresponde a la búsqueda de proteínas homólogas a la proteína blanco. Para esto se envía la secuencia aminoacídica de la Apo E al motor de búsqueda del programa FUGUE. Se selecciona el (o los) templado (s) más adecuado (s) entre todos los entregados, utilizando como guía los puntajes entregados por FUGUE y otras consideraciones propias del problema.

FUGUE entrega una serie de archivos que contienen los alineamientos en distintos formatos, de estos el archivo a utilizar es el que posee extensión .ali. Este archivo se modifica para que pueda ser reconocido por MODELLER, según el formato presentado en el Anexo III.

MODELLER es un programa computacional que se basa en el lenguaje *Phyton*. Todos los programas que se ejecutan, corresponden a líneas de código *Phyton* almacenadas en archivos de texto con extensión .py. Todos estos archivos, junto con los archivos de alineamiento (con extensión .ali) y de estructura (extensión .pdb) deben estar ubicados en la misma carpeta en el computador. Para comenzar a realizar el modelamiento, se abre el programa desde su ubicación o desde el ícono de acceso directo, apareciendo una ventana de comandos tipo MS-DOS. Utilizando el comando *cd nombre de la carpeta* se debe acceder a la carpeta donde se encuentran los archivos. Luego para ejecutar un código, se escribe en la línea de comandos la instrucción *mod9v3 nombre del programa.py*. Esta instrucción puede variar dependiendo de la versión del programa utilizada, la que aquí se presenta corresponde al comando de ejecución para la versión 9.3.

Una vez modificado el alineamiento elegido, se ejecuta la herramienta *alignment.check* () que lo analiza superficialmente, buscando pares equivalentes de carbonos alpha y verificando si existen más de 6 u 8 Å de distancia atómicas entre sí.

A continuación se ejecuta el código que generará los modelos tridimensionales de la proteína. El código utilizado entregó 50 modelos ligeramente diferentes entre sí para la proteína de interés.

De los 50 modelos generados, se seleccionaron cuatro. Los criterios utilizados para esta selección fueron:

- Menor puntaje de energía DOPE.
- Puntaje GA341 más cercano a 1.0.
- Menor valor de la función de minimización utilizada por el programa (*molpdf*).
- Menor número de restricciones no respetadas.

Luego, se generaron los perfiles de energía DOPE para cada uno de estos tres modelos. Éstos se graficaron junto con los perfiles de los templados utilizando el programa GNUplot. Comparando los perfiles se postulan zonas de conflicto del modelo.

Con cada uno de estos tres modelos, se realizó el proceso de refinamiento de bucles. Las zonas a refinar fueron las mismas para todos y corresponden a zonas de conflicto dentro del modelo, tales como diferencias en la forma del perfil de energía DOPE, zonas sin templado, y zonas de unión entre los templados. Se generaron 50 modelos posibles con el refinamiento, de los cuales se escogió el mejor en función de la energía DOPE.

Finalmente, se realiza la evaluación de los tres modelos obtenidos con el programa PROCHECK y se escoge el más adecuado en función de los distintos parámetros evaluados. El programa de evaluación requiere como parámetro la resolución con la que fue obtenida el modelo para la fabricación de los gráficos que entrega, dado que los modelos por homología no tienen asociado este parámetro, se decidió utilizar un valor de resolución de 2 Å ya que es normalmente aceptado como una buena resolución e impone un estándar apropiado de evaluación.

Todos los códigos utilizados en los modelamientos indicados, se presentan en el Anexo III.

2.3 Cálculo hidrofobicidad superficial

A partir de la estructura tridimensional de una proteína, es posible calcular su hidrofobicidad superficial. El primer paso corresponde al cálculo de las áreas superficiales expuestas de cada tipo de aminoácido presente en la proteína. Para esto se utiliza el programa GRASP (*Graphical Representation and Analysis of Structural Properties*). Las instrucciones computacionales utilizadas se detallan en el Anexo IV.

El segundo requerimiento, corresponde a la hidrofobicidad propia de cada tipo de aminoácidos. La escala seleccionada para esto corresponde a la propuesta por Miyazama-Jernigan, la cual es normalizada utilizando su máximo y su mínimo para entregar valores entre 0 y 1. (Anexo I)

Reemplazando los valores anteriores en la Ecuación 3 y en la Ecuación 4 presentadas en el Capítulo 1.1, se obtiene el resultado buscado.

2.4 Sistema de dos fases acuosas

2.4.1 Materiales para sistemas de dos fases acuosas

Reactivos

- Polietilenglicol Peso Molecular 1000 (PEG 1000). (Sigma)
- Potasio Fosfato Bibásico Trihidrato, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ Grado analítico. (Merck)
- Sodio Dihidrógenofosfato Monohidrato, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ Grado analítico. (Merck)
- Albumina de suero bovino (BSA) (Sigma)
- Agua Milli-Q.
- Muestras de suero de rata.

Soluciones

- **Solución stock PEG 1000:** 50% p/p de PEG 1000 en agua milli-Q.
- **Solución stock Fosfato:** 30% p/p de Fosfato de Potasio en agua milli-Q, pH 7.0.

2.4.2 Construcción de la curva binodal

Para la construcción de la curva binodal se realizan los siguientes pasos. Primero se prepara una solución *stock* de PEG 1000 y una solución *stock* de Fosfato de Potasio. Utilizando un picnómetro se mide la densidad de ambas soluciones.

Se toma un volumen conocido de solución *stock* de PEG 1000 (2mL). Se agrega un volumen dado de solución *stock* Fosfato (100 μ L), repitiendo lo anterior hasta que la solución se enturbie, lo que implica la formación de dos fases inmiscibles. Luego se agrega agua en forma discreta de 50 μ L, hasta que la solución se vuelva a aclarar (una fase). Se registran los volúmenes agregados, para el posterior cálculo de concentraciones. Se agregan 100 μ L más de solución *stock* Fosfato y se repite el procedimiento hasta completar al menos 20 puntos. Luego se realiza el mismo proceso pero partiendo con 2 mL de solución *stock* Fosfato y agregando de a 100 μ L la solución *stock* PEG 1000.

Con los datos obtenidos, se determina a que concentración de PEG y Fosfato se pasa de un sistema de dos fases (turbio) a una sola fase (claro). Estos puntos se grafican y se ajustan al modelo de Mistry (Mistry y otros, 1996), obteniéndose los parámetros A, B y C que especifican la ecuación de la curva binodal. Los parámetros se obtienen mediante la minimización del error cuadrático medio. Además, mediante el análisis estadístico de los datos se obtiene el coeficiente de correlación (R) entre la curva de ajuste y los datos experimentales.

Ecuación 5

$$Y = \exp(A + BX^{0.5} + CX^3)$$

2.4.3 Construcción de líneas de equilibrio

Se desea determinar la línea de equilibrio cuyo largo (TLL, *Tie Line Length*) es 45, dado que se ha postulado una separación diferencial de las proteínas séricas en concentraciones trazas cuando son sometidas a un sistema ATPS con TLL de 45 (Benavides y otros, 2007).

Primero es necesario conocer algunas líneas de equilibrio al azar. Para esto se construye un sistema de composición global dada, se espera que se formen las dos fases y se pesa cada una de ellas. Luego resolviendo el sistema de ecuaciones formado por los balances de masa para ambos componentes del sistema y la ecuación de la curva binodal, expresada para las composiciones de ambas fases, se obtienen las concentraciones de las fases superior e inferior que se encuentran en este equilibrio, coordenadas de la *tie line*.

Ecuación 6: Balance de masa para PEG 1000.

$$Y_T = \left(\frac{Y_M}{\alpha} \right) - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha} \right) \cdot Y_B$$

Ecuación 7: Balance de masa para Fosfato.

$$X_T = \left(\frac{X_M}{\alpha} \right) - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha} \right) \cdot X_B$$

Ecuación 8: Ecuación de la curva binodal expresada para la composición de la fase superior del sistema.

$$Y_T = \exp(A + BX_T^{0.5} + CX_T^3)$$

Ecuación 9: Ecuación de la curva binodal expresada para la composición de la fase inferior del sistema.

$$Y_B = \exp(A + BX_B^{0.5} + CX_B^3)$$

donde Y_T (Y_B) y X_T (X_B) corresponden a las composiciones en porcentaje peso-peso de PEG y Fosfato en la fase superior (inferior), respectivamente. Y_M y X_M corresponden a las composiciones globales de PEG y Fosfato en el sistema y α a la razón entre la masa de la fase superior y la masa total del sistema.

Una vez obtenidas las distintas líneas de equilibrio, se calcula su punto de intersección promedio que corresponde al punto de fuga del sistema, punto por donde deben pasar todas las líneas de equilibrio. Luego, se resuelve el sistema formado por las ecuaciones: Ecuación 8, Ecuación 9, y Ecuación 10; imponiendo como restricción que la recta que une los puntos (X_B, Y_B) y (X_T, Y_T) debe contener al punto de fuga (X_F, Y_F) , representada en la Ecuación 11.

Ecuación 10: Largo de la línea de equilibrio. 45 corresponde al valor deseado.

$$TTL = \sqrt{(X_B - X_T)^2 - (Y_T - Y_B)^2} = 45$$

Ecuación 11: Ecuación de la recta de una línea de equilibrio que pasa por el punto de fuga del sistema.

$$Y_T - Y_F = \frac{Y_F - Y_B}{X_F - X_B} \cdot (X_T - X_B)$$

Así, se obtiene una aproximación de la composición global del sistema que pertenece a la línea de equilibrio deseada. Esto se comprueba experimentalmente.

2.4.4 Construcción del sistema

Una vez determinada la composición global en peso del sistema que se va a construir, se pesan las cantidades necesarias de Fosfato (64% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ y 36% $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) y el agua. Una vez disueltas las sales, se pesa el PEG y se agrega al sistema. Se debe considerar si la muestra a agregar al sistema está en solución acuosa, de ser así, al volumen de agua se le debe descontar el volumen de la muestra. Se prepara una masa total que permita ajustar el pH de la solución correctamente.

Se consideró la construcción de dos sistemas análogos. La única diferencia entre ellos radica en la muestra a tratar. En uno de ellos se aplicó, previa centrifugación, directamente la muestra de suero de rata, mientras que en el segundo sistema, la muestra fue diluida en razón volumétrica de 1:2.

Se midió la concentración de proteína total en cada una de las fases utilizando el método de Bradford modificado (Anexo V).

2.4.5 Análisis por geles de acrilamida

Para analizar la composición proteica de cada una de las fases formadas, se realizaron geles de poliacrilamida denaturantes (SDS-PAGE) al 12,5%.

Se tomaron 100 μL de la fase superior, 200 μL de la interfase y 300 μL de la fase inferior. Las muestras de las interfases fueron centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos (Centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) para separar el *pellet* blanquecino del sobrenadante. Todas las muestras se sometieron a precipitación con TCA, concentrando las proteínas y eliminando parcialmente el PEG 1000 y los fosfatos que interfieren en la realización de los geles SDS-PAGE.

Luego, las muestras de la fase superior se resuspendieron en 500 μL de agua mili-Q y las de la interfase (tanto *pellet* como sobrenadante) y fase inferior en 100 μL , para ser cargadas a los geles de acrilamida que fueron teñidos con una solución de Azul de Coomassie y posteriormente con Nitrato de Plata para apreciar bandas de proteínas que se encuentran en menor concentración.

Todos los procedimientos aquí descritos se especifican en el Anexo V.

2.5 Cromatografía de afinidad

2.5.1 Materiales para cromatografía de afinidad

Reactivos

- Sefarosa 6B epoxi-activada (Resina)
- 3,3',5,5''-Tetraiodo-L-tiroxina, cromatografía. (Sigma)
- Dimetilsulfóxido desecado (DMSO), $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ Grado analítico. (Merck)
- Borato de Sodio, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ Grado analítico. (Purom)
- Etanolamina, $\text{N}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ Cultivo celular. (Sigma-Aldrich)

- Tris Base, $C_4H_{11}NO_3$ Biología molecular. (Winkler)
- Ácido Clorhídrico fumante 37%, HCl (Merck).
- Cloruro de Sodio, NaCl Grado analítico. (Merck)
- Acetato de Sodio, C_3COONa Grado analítico. (Merck)
- Ácido Acético glacial 100%, CH_3COOH Grado analítico. (Merck)
- Di-sodio Hidrógenofosfato Dihidrato, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ Grado analítico. (Merck)
- Sodio Dihidrógenofosfato Monohidrato, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ Grado analítico. (Merck)
- Trisodio Citrato Dihidrato, $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ Grado analítico. (Merck)
- Ácido Cítrico Monohidrato, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ Grado analítico. (Merck)
- Etanol, C_2H_5OH Cromatografía. (Merck)

Soluciones

- **Buffer A:** Buffer Fosfato de Sodio 100 mM, pH 9,7
- **Buffer B:** Buffer Borato 50 mM, pH 9,2.
- **Buffer de acoplamiento 1:** 50% v/v de DMSO con 0,111 gr/mL de tiroxina ajustado a pH 9,7, 50% v/v buffer A (o 50% v/v buffer B)
- **Buffer de acoplamiento 2:** 50% v/v de DMSO con 0,056 gr/mL de tiroxina, 50% v/v buffer A. (o 50% v/v buffer B)
- **Buffer lavado exceso de ligando:** 50% v/v de DMSO, 50% v/v buffer A.
- **Solución de bloqueo:** etanolamina 1M, pH 8.0 ajustado con HCl en hielo.
- **Buffer de regeneración pH alto:** Tris Base 0.1M, Cloruro de Sodio 0,5 M, pH 8.0 ajustado con Ácido Clorhídrico.
- **Buffer de regeneración pH bajo:** Acetato de Sodio 0,1 M, Cloruro de Sodio 0,5 M, pH 4.0 ajustado con Ácido Acético.
- **Buffer de muestra A:** Dihidrogen fosfato de sodio 50 mM, Cloruro de Sodio 150 mM, pH 7.2.
- **Buffer de muestra B:** Buffer Fosfato de Sodio 50 mM, pH 7.0
- **Buffer de elución 1:** 88,5 % v/v de solución de Trisodio Citrato 100 mM, 11,5% v/v de Ácido Cítrico, pH 6.0.
- **Buffer de elución 2:** 65% v/v de solución de Trisodio Citrato 100 mM, 35% v/v de Ácido Cítrico, pH 5.0.
- **Buffer de elución 3:** 41% v/v de solución de Trisodio Citrato 100 mM, 59% v/v de Ácido Cítrico, pH 4.0.

2.5.2 Preparación de la columna.

Dado que el proceso cromatográfico se realiza manualmente, el medio de separación se construye en una columna PD-10 vacía con un filtro en su parte inferior, para evitar el escape de la resina.

Se agregan 0,286 gr. de resina y se resuspende con agua milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 1 mL. Luego se realiza el lavado de la resina para eliminar los aditivos que posee, que consiste en la aplicación dosificada de 200 mL de agua milli-Q por gramo de resina utilizado. En este caso, se agregan 6 mL de agua a la columna y se deja en agitación por inversión durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se elimina el agua por flujo gravitacional. Los pasos anteriores se repiten 6 veces. Finalmente, se comprueba que el efluente tenga pH cercano a la neutralidad.

A continuación se debe acoplar el ligando a la resina. Este paso fue realizado de dos maneras, para la primera se agregan 2 mL de buffer de acoplamiento 1 a la resina y en la segunda se agregan 4 mL de buffer de acoplamiento 2, así se mantiene constante la cantidad de tiroxina pero se disminuye su concentración lo que evita los problemas de solubilidad. Ambas reacciones de acoplamiento se incuban a 40° C por toda la noche con agitación por inversión.

Luego se debe lavar el exceso de ligando no adherido a la resina, para esto se utiliza el buffer de lavado exceso de ligando agregado alícuotas de 3 mL con incubación por inversión durante 5 minutos, 5 veces.

Se mide la absorbancia a 240 nm (Espectrofotómetro, UltroSpec 3000, Pharmacia Biotech, Dinamarca) del buffer de acoplamiento agregado a la resina y de las muestras de lavado de exceso de ligando, para así comprobar la adsorción de la tiroxina.

Finalmente, se deben bloquear los sitios activos que no reaccionaron durante la reacción de acoplamiento. Para esto la resina se incubó por toda la noche a aproximadamente 37° C con 2 mL de solución de bloqueo (Economy Incubator with fan, Gallenkamp Ltd, Inglaterra).

2.5.3 Preparación de la muestra

Se utilizaron dos tipos de muestras. Las primeras (Muestras A) corresponden a muestras de suero previamente tratadas en una columna comercial de inmunoafinidad para la remoción de albúmina (*Murine Albumin Depletion Kit*, Qiagen). El protocolo para la etapa de remoción corresponde al procedimiento estándar recomendado por el fabricante. Las proteínas de estas muestras se encuentran suspendidas en el buffer de muestra A. El segundo tipo de muestra corresponde a colecciones de la fase inferior del sistema de dos fases acuosas previamente comentado (muestras B), dado esto, las proteínas se encuentran en una suspensión principalmente formada por buffer fosfato, pH 7.0.

El volumen de muestra aplicado fue variable. Cuando se utilizaron las muestras A, se cargaron a la columna entre 400 y 900 µL dependiendo del número de lavados realizados a la columna de

depleción. Cuando se utilizaron muestras de fase inferior el volumen cargado a la columna fue de 2,5 mL.

2.5.4 Condiciones de operación.

Antes de comenzar a operar la columna, ya sea luego de su preparación o después de la realización de una cromatografía, la matriz sólida debe ser regenerada. Esto se hace aplicando tres ciclos de lavado que consideran la aplicación de 3 volúmenes de columna de buffer de regeneración de pH alto con 5 minutos de agitación por inversión y 3 volúmenes de columna de buffer de regeneración de pH bajo, también bajo agitación.

Posteriormente, la resina debe ser equilibrada al pH y condiciones en las que será aplicada la muestra. Este proceso se lleva a cabo aplicando a la columna 3 volúmenes de columna del correspondiente buffer de muestra (A o B) dependiendo de la muestra que se va a tratar en la columna, se somete a 5 minutos de agitación por inversión y luego se drena la solución gravitacionalmente. Repetir 5 veces.

Se probaron distintas maneras de aplicación de la muestra a tratar en la columna, para analizar su posible efecto sobre la formación del complejo proteína-ligando. Entre ellas se cuentan:

- Mono-aplicación de la muestra completa y recolección inmediata.
- Triple aplicación de la muestras. Se aplica en un paso toda la muestra, se colecta y se vuelve a pasar por la columna, 3 veces.
- Aplicación con incubación: 1 hora con agitación por inversión a 37° C; 5 y 24 horas con agitación por inversión a temperatura ambiente.

Luego de la aplicación de la muestra, las proteínas que no permanecen adsorbidas a la matriz deben ser eluidas. Para esto se realiza una etapa de lavado de la columna, el que se efectúa con el mismo buffer que se utiliza para equilibrarla. Se cargan 20 volúmenes de columna de dos en dos y se colecta cada fracción por separado en tubos eppendorf de 2 mL, para su posterior análisis.

2.5.5 Condiciones de elución.

Para la elución de la proteína de interés se realiza un gradiente de pH escalonado que considera tres condiciones de pH, 6.0, 5.0 y 4.0. Todos los buffer de elución fueron aplicados a la columna

de 2 mL en 2 mL, totalizando 10 volúmenes de columna. Cada muestra de 2 volúmenes de columna se colectó para el posterior análisis de composición.

Una vez finalizado el proceso de elución, la resina debe ser regenerada, tal como se indicó anteriormente. La columna se almacena en 2 volúmenes de columna de etanol al 20%.

2.5.6 Análisis de las fracciones por geles de acrilamida SDS-PAGE

Para analizar la composición proteica de cada fracción recolectada de la cromatografía, se realizaron geles de poliacrilamida denaturantes (SDS-PAGE) al 12,5%.

Dado que las proteínas presentes en las colecciones obtenidas de la cromatografía se encuentran muy diluidas, se probaron dos procesos de concentración, liofilización y precipitación por TCA. En la mayoría de los casos, las muestras se resuspenden en 15 μ L de agua mili-Q al que se le agrega 5 μ L de buffer de carga concentrado.

Los geles se tiñen con una solución de Azul de Coomasie y posteriormente con Nitrato de Plata para apreciar bandas de proteínas que se encuentran en menor concentración.

Todos los procedimientos estándar utilizados en este capítulo se describen en el Anexo V.

Como resumen del proceso de separación especificado, se presenta el siguiente diagrama.

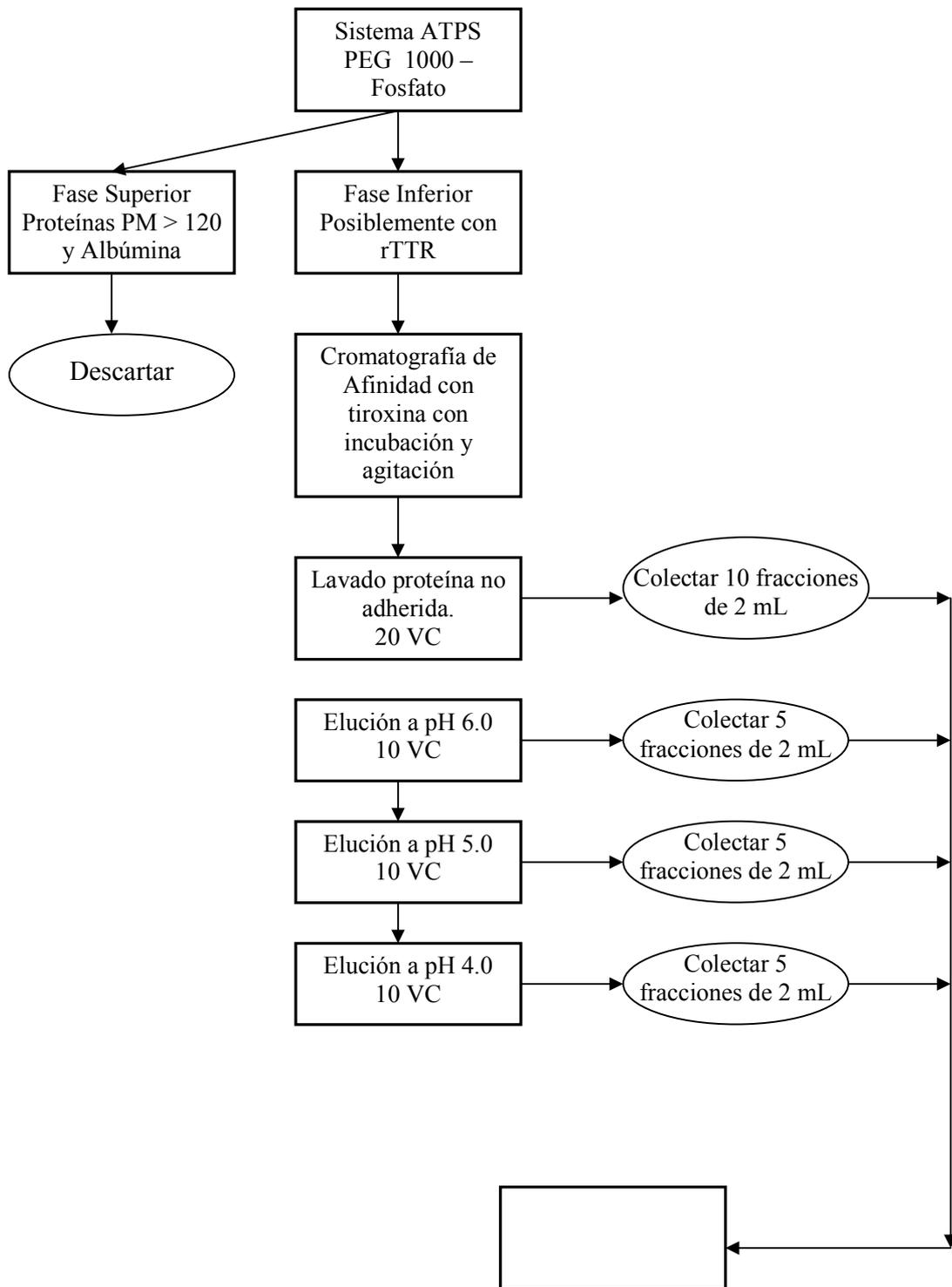


Figura 5: Diagrama explicativo del proceso de purificación estudiado.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de peso molecular (PM), punto isoeléctrico (pI) e hidrofobicidad superficial.

3.1.1 Extracción de proteínas desde gel de acrilamida

Luego de la realización de la primera técnica de extracción se cuantificó la proteína total liberada mediante la medición de la absorbancia a 280 nm. La curva de calibración utilizada para transformar los datos de absorbancia a concentración se presenta en el Anexo VI. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Concentración de proteína liberada desde los trozos de geles SDS-PAGE utilizando la primera técnica de elusión.

Proteína	Abs (280 nm)	Concentración [mg/mL]
Transtiretina	0,050	0,103
Apolipoproteína E	0,127	0,229

Claramente las concentraciones entregadas por el método de absorbancia a 280 nm resultan bastante anómalas, ya que son muy elevadas. Además se contradice con la observación de los trozos de gel, dado que el trozo asociado a la ApoE era mucho más pequeño y menos azul (indicando menos proteína) que el trozo con Transtiretina. Según las condiciones bajo las que se realizaron los geles, reportadas por la Profesora Andrea Mahn, la máxima cantidad de proteína por trozo de gel era de 75 ng. Considerando los volúmenes utilizados para las extracciones (20 μ L) se esperaba una concentración máxima de 0,00375 mg/mL.

Para comprobar la eficiencia de las técnicas de extracción y determinar el peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas eluidas, se realizaron geles de IEF y SDS-PAGE en el equipo *PhastSystem*, seleccionado debido a que presenta mayores niveles de sensibilidad que los métodos tradicionales. (1 a 5 ng de proteína por banda para IEF y 0,3 a 0,5 ng de proteína por banda para SDS-PAGE, ambos teñidos con nitrato de plata). Los resultados obtenidos luego de la primera técnica de extracción se presentan en la Figura 6.

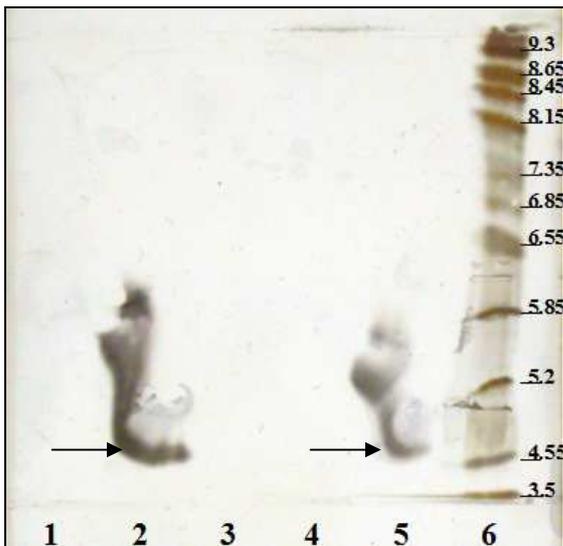


Figura 6: Gel de isoelectroenfoque realizado en equipo *PhastSystem*. 1) Apolipoproteína E, 2) Muestra de BSA con concentración 0,3 mg/mL, 3) Vacío, 4) Transtiretina, 5) Muestra de BSA con concentración de 0,1 mg/mL, 6) Estándar de punto isoeléctrico.

Se observa que todas las muestras cargadas en el gel de IEF migraron de manera bastante irregular, sin embargo las zonas inferiores (indicadas con flechas) de los carriles 2 y 5 pueden asociarse a las muestras de BSA cuyo punto isoeléctrico es de 4,78 aproximadamente.

No se distinguen bandas asociadas a las proteínas de interés en los carriles donde fueron cargadas, atribuible a un bajo rendimiento del protocolo de extracción o a problemas en la sensibilidad del método.

Si se asume que el protocolo de extracción presentó un desempeño adecuado, la máxima concentración de la muestra cargada al gel de IEF es de 0,00375 mg/mL. Dado que se cargaron 4 μ L de muestra, la cantidad de proteína presente en el gel sería de 12 ng. Este valor es mayor que el límite de sensibilidad reportado por el fabricante del equipo *PhastSystem* (3 a 5 ng), sin embargo la máxima cantidad de proteína detectada en la prueba de sensibilidad realizada fue de 180 ng (Anexo II). Dado esto, no es posible asegurar un mal desempeño del protocolo de extracción, debido a que su máximo desempeño se encuentra fuera del límite de detección.

Por otra parte, las muestras obtenidas desde segunda técnica de extracción fueron concentradas utilizando liofilización. Se presentaron dificultades en la evaporación de los solventes por lo que la liofilización tuvo que extenderse por toda la noche. Como resultado, se observa la presencia de fibras fuertemente adheridas a las paredes de los tubos que dificultaron la resuspensión de las muestras para su carga al gel de SDS-PAGE. Las muestras fueron centrifugadas para evitar agregar restos sólidos al gel. Los resultados se presentan en la Figura 7.

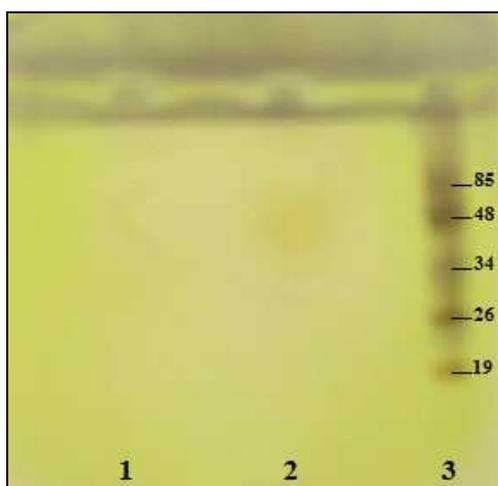


Figura 7: Gel SDS-PAGE realizado en el equipo *PhastSystem*. 1) Transtiretina, 2) Apolipoproteína E, 3) Marcador de peso molecular.

No se logró visualizar ninguna banda asociada a las proteínas de interés. La cantidad de proteína cargada, si se asume que la muestra posee la concentración máxima posible de obtener, es de 12 ng. Este valor se encuentra muy por sobre el valor de detección mínimo reportado por el fabricante del equipo (0,1 a 0,3 ng) y corresponde al límite detectado en la prueba de sensibilidad realizada para geles SDS-PAGE.

Así, al igual que en el proceso de extracción 1, no se posible reportar malos desempeños de la técnica de extracción 2, ya que los mejores resultados que se pueden obtener se encuentran bajo el límite de detección del equipo.

Dados los resultados anteriores se optó por utilizar los valores de PM y pI determinados por la Profesora Andrea Manh a partir de geles de bidimensionales de muestras de suero. En la Figura 8 se muestran dichos resultados.

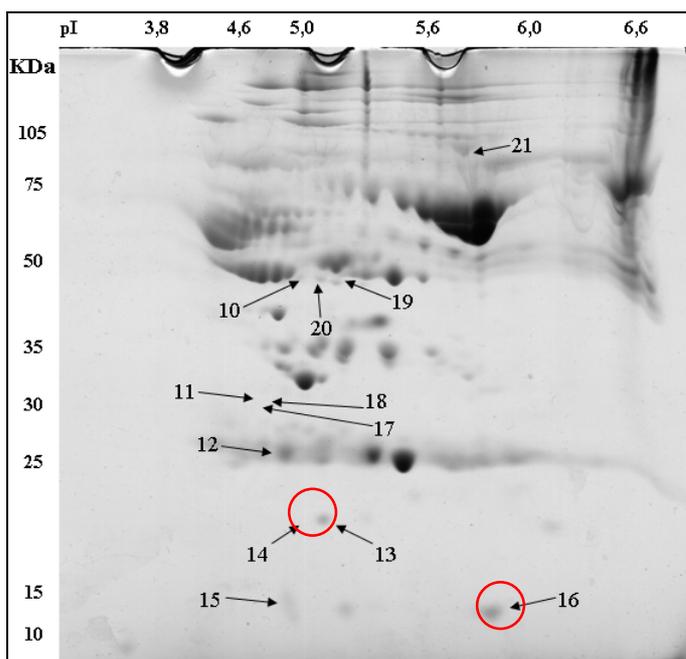


Figura 8: Gel bidimensional realizado por la Profesora Andrea Mahn con muestras de plasma de ratas. El *spot* 16 corresponde a la Transtiretina y el *spot* 13 a la Apolipoproteína E.

Además, se obtuvieron dichas propiedades directamente a partir de secuencia aminoacídica de ambas proteínas utilizando la herramienta *ProtParam* del servidor *ExPaSy Proteomic Server*. En la siguiente tabla se presenta una comparación de las propiedades teóricas y experimentales.

Propiedad	Transtiretina	Apolipoproteína E
PM teórico	13598 Da	34236 Da
PM experimental	13000 Da	20000 Da
pI teórico	5,77	5,22
pI experimental	5,6 - 6,0	5,0 - 5,6

Figura 9: Pesos moleculares y puntos isoeléctricos obtenidos desde la secuencia de aminoácidos entregados por *ProtParam* (teórico) y desde gel bidimensional (experimental).

La mayoría de los valores experimentales obtenidos son congruentes con los valores teóricos calculados a partir de la secuencia. La única excepción se observa en el peso molecular experimental de la proteína rApoE, que reporta una diferencia de cerca del 42%. Se cree que esta gran diferencia puede deberse a que la proteína migró de manera irregular en el gel, ya que toda la información recopilada indica que el peso molecular promedio obtenido experimentalmente para la rApoE es muy cercano a los 34000 Da.

3.1.2 Hidrofobicidad superficial promedio

Las hidrofobicidades superficiales de rTTR y rApoE fueron obtenidas mediante el cálculo de las áreas superficiales expuesta realizado por la herramienta de visualización GRASP, que utiliza como sonda una partícula esférica de radio 1,4 Å, valor recomendado por el programa.

Transtiretina

La suma de las áreas superficiales expuestas para cada tipo de aminoácido, para las cuatro estructuras de Transtiretina disponibles en la base de datos *Protein Data Bank* se presenta en el Anexo VIII.

Se observa que para cada clase de aminoácido, se conserva el orden de magnitud del área calculada, lo que indica que las diferencias entre las estructuras son bastantes pequeñas.

Reemplazando los valores obtenidos en las fórmulas mencionadas en el Capítulo 2.3, se obtienen los valores de hidrofobicidad superficial promedio para cada estructura.

Tabla 2: Hidrofobicidad superficial promedio.

	Código de la estructura			
	1GKE	1IE4	1KGI	1KGJ
Hidrofobicidad superficial promedio	0,25	0,24	0,23	0,24

Los valores de hidrofobicidad calculados son muy similares para las cuatro estructuras disponibles, con un promedio de 0,24. La desviación estándar asociada a este promedio de tan sólo un 4,2 % aproximadamente. Comparando este valor con la hidrofobicidad superficial promedio de la proteína de membrana *Neisserial surface protein A* (NspA), 0,385, puede considerarse que rTTR es una proteína de carácter medianamente hidrofílica.

Apolipoproteína E

La hidrofobicidad superficial promedio de la ApoE fue obtenida a partir de los tres mejores modelos construidos en el proceso de modelación por homología. Se calculó para tres modelos para poder analizar la desviación que existe en el valor de hidrofobicidad si el modelo cambia discretamente. Las áreas superficiales obtenidas se presentan en el Anexo VIII. Reemplazando los datos anteriores, se obtuvo una hidrofobicidad superficial promedio de 0,33 con desviación estándar de un 6%, lo que al compararla con la HSP de la proteína de membrana NspA, indica que la ApoE es una proteína de carácter hidrofóbico.

Como se detallará en el capítulo siguiente, los modelos generados presentan alfa hélices agrupadas, al igual que el modelo disponible en la base de datos UniProt. Como ya fue comentado, es probable que este modelos no sean representativos de la estructura que adopta la ApoE cuando se encuentra formando parte de apolipoproteínas, ya que en esta situación las partes hidrofóbicas de la proteína pueden interactuar con el núcleo lipídico adoptando una configuración extendida. A pesar de esto, la hidrofobicidad superficial calculada a partir de ellos puede considerarse como una buena aproximación, ya que tanto en la situación modelada como en la real, las zonas hidrofóbicas se encuentran escondidas, ya sea interactuando entre ellas para agrupar las alpha hélices o participando en interacciones hidrofóbicas con el núcleo lipídico de la apoproteína.

Finalmente, se destaca la baja sensibilidad (desviación estándar) de la hidrofobicidad superficial. En ambos casos, ligeras alteraciones en la estructura tridimensional de la proteína sólo produjeron pequeños cambios en el valor de la hidrofobicidad.

Dado que las áreas superficiales expuestas para cada aminoácido de cada proteína, fueron obtenidas utilizando como sonda una molécula esférica de radio 1,4 Å, los valores de hidrofobicidad superficial promedio calculado sólo son válidos cuando las proteínas se encuentran en un solvente cuyas moléculas puedan simularse como esferas de radio similar al utilizado en la sonda, como es el caso de las soluciones acuosas.

La hidrofobicidad de las proteínas obtenida, puede ser utilizada como parámetros de entrada en diversos modelos matemáticos que, por ejemplo, permiten estimar cómo migrará la proteína en un sistema de dos fases acuoso específico o el tiempo de retención en una cromatografía de interacción hidrofóbica. Sin embargo, al momento de utilizar estas correlaciones se debe tener claro que sólo son válidas para las condiciones bajo las cuales se realizaron los experimentos. Así, no fue posible estimar el coeficiente de partición para las proteínas de interés dado que no se reportan correlaciones para sistemas PEG 1000 –Fosfato.

A modo de resumen se presenta la Tabla 3.

Tabla 3: Resumen de propiedades fisicoquímicas de rTTR y ApoE.

Propiedad	Transtiretina	Apolipoproteína E
PM experimental	13000 Da	20000 Da
PM teórico	13598 Da	34236 Da
pI experimental	5,6 - 6,0	5,0 -5,6
pI teórico	5,77	5,22
Hidrofobicidad superficial promedio	0,24 ± 0,01	0,33 ± 0,02

3.2 Modelamiento por homología

A continuación se presentan los resultados obtenidos para el modelamiento por homología de la estructura tridimensional de la proteína Apolipoproteína E de rata, sin considerar el péptido señal. Debe recordarse que la finalidad de este modelo es ser útil para el cálculo de la hidrofobicidad superficial promedio de la proteína.

3.2.1 Molde y Alineamiento

La búsqueda de moldes se realizó con el motor de búsqueda del programa FUGUE, el cual entregó seis familias de proteínas homólogas a la proteína blanco, con un nivel de confianza del 99% al utilizar el valor de corte recomendado por el programa (z -score =6.0). Cada una de estas familias posee sólo un miembro.

La proteína de la primera familia, con código hs2a01a en la base de datos HOMSTRAD, corresponde a la Apolipoproteína A-I Humana cuya estructura tridimensional obtenida por difracción de rayos X (resolución 2,4 Å) se encuentra disponible en la base de datos *Protein Data Bank* bajo el código P02647. Esta proteína es la que presenta un mayor puntaje z -score (24,93) entre todas las proteínas entregadas. Las familias restantes fueron:

- hsd1bz4a: Apolipoproteína E3 humana.
- hs1aep: Apolipoforina 3.
- hs2j69a: *dynamin-like protein* bacteriana.
- hs1oef: Apolipoproteína E humana. Presenta disponible la estructura tridimensional de los residuos 263-286, obtenida por Resonancia Magnética Nuclear (NMR), con código P02649.
- hs1qoya: Hemolisina de *Escherichia coli*.

Se seleccionó como molde principal la Apolipoproteína A-I humana (ApoA-I), principalmente por ser la proteína con mayor z -score, pertenecer al mismo grupo de proteínas que la ApoE y presentar el mayor número de aminoácidos alineados.

3.2.2 Modelos obtenidos

Con el alineamiento anterior se generaron 50 modelos ligeramente diferentes entre sí, que fueron sometidos a la evaluación interna de MODELLER. Se seleccionaron cuatro modelos en función de su energía DOPE y del valor de la función de minimización (molpdf), ya que el otro parámetro de evaluación (Puntaje GA341) fue muy cercano a uno para todos los modelos construidos. A continuación se presentan los parámetros obtenidos para los modelos seleccionados.

Tabla 4: Resumen de parámetros utilizados como criterios de selección, para los modelos seleccionados.

Modelo	Energía DOPE	Puntaje GA341	molpdf
Modelo 3	-21357,65	1,00	1470,94
Modelo 22	-21317,18	1,00	1397,91
Modelo 24	-21406,61	1,00	1360,11
Modelo 33	-21695,88	1,00	1560,48

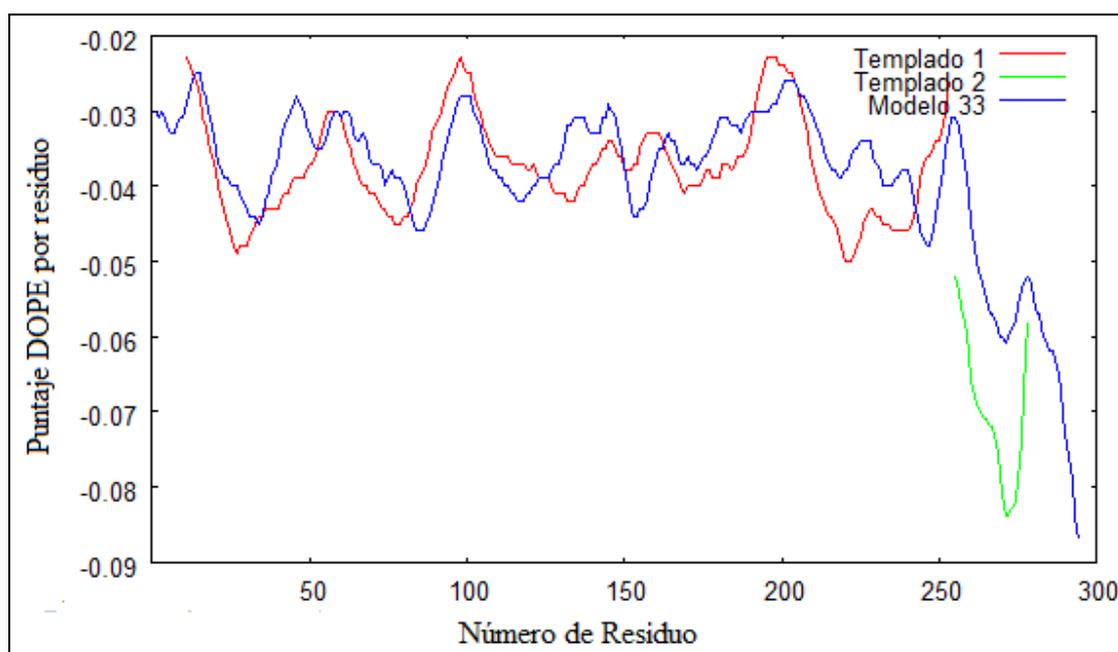


Figura 10: Comparación de los perfiles energéticos DOPE entre uno de los modelos seleccionados y los templados utilizados.

En la Figura 10 se presentan los perfiles energéticos entregados por la herramienta de evaluación de MODELLER. En línea roja se muestra el molde principal ApoA-I, en azul uno de los modelos seleccionados y en verde el pequeño segmento de la proteína hApoE. Se espera que un buen modelo presente un perfil energético similar a los templados utilizados, sin embargo no se puede realizar una comparación numérica, ya que los puntajes DOPE no son medidas absolutas. Se observa que el modelo presentado posee cierto grado de similitud con los moldes, pero se

reconocen ciertas zonas de conflicto, por ejemplo la zona ubicada aproximadamente entre los aminoácidos 220-230.

Los gráficos de perfiles energéticos obtenidos para los otros tres modelos seleccionados pueden ser revisados en el Anexo VIII.

3.2.3 Refinamiento de bucles

El siguiente paso para la construcción del modelo definitivo considera el refinamiento de bucles u otras zonas problema dentro del modelo. Se decidió realizar el refinamiento de las siguientes zonas:

- Aminoácidos 1-10: Se seleccionó principalmente debido a que no presenta templado.
- Aminoácidos 220-230: por ser una zona de elevada energía.
- Aminoácidos 247-257: ya que corresponden a la vecindad que rodea el sitio de unión de los templados. Esto suele ser una zona de conflicto.

El refinamiento de bucles se llevó a cabo tomando como modelo inicial cada uno de los modelos seleccionados anteriormente. El código utilizado genera 50 nuevos modelos que poseen posiciones ligeramente diferentes para las zonas de conflicto modeladas. Una muestra de esto puede apreciarse en la Figura 11.

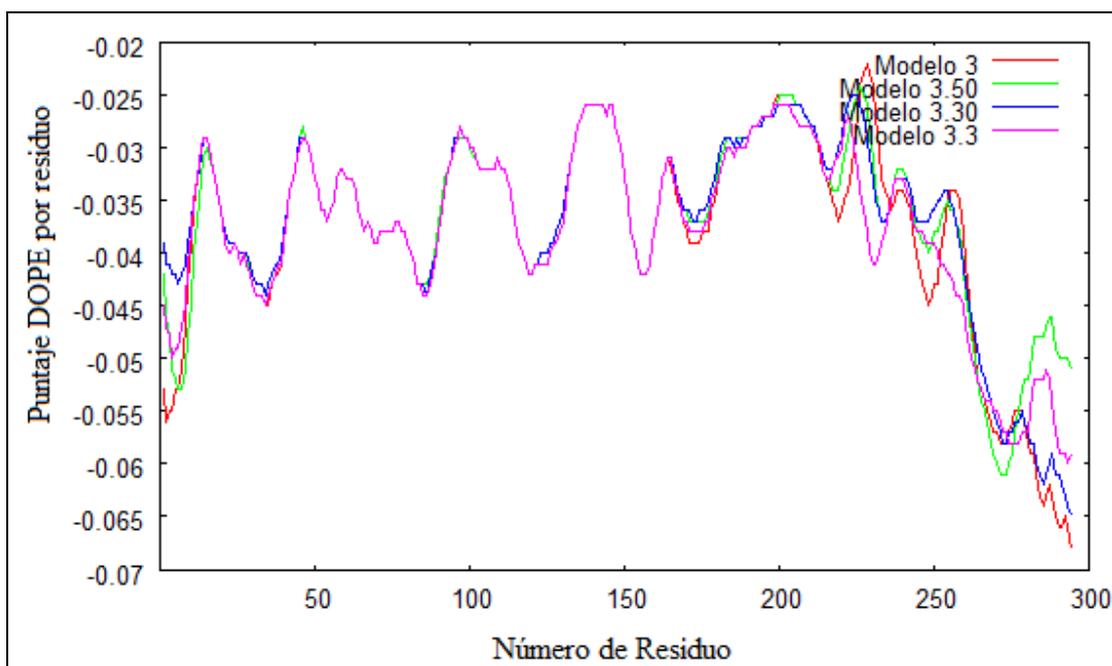


Figura 11: Representación de los perfiles energéticos de tres modelos obtenidos por refinamiento de bucles a partir del Modelo 3.

De cada grupo de 50 modelos, se seleccionaron los mejores tres tomando como base la energía DOPE de cada uno de ellos. Así se obtienen 12 modelos, para ser analizados en mayor profundidad con el programa PROCHECK.

Tabla 5: Energía DOPE obtenida para los modelos seleccionados luego del refinamiento de bucles.

Modelos	Energía DOPE
Modelo 3.33	-21881,12
Modelo 3.30	-21890,90
Modelo 3.50	-21836,27
Modelo 22.17	-21942,35
Modelo 22.20	-21953,86
Modelo 22.48	-21914,20
Modelo 24.4	-21670,58
Modelo 24.7	-21796,61
Modelo 24.47	-21737,72
Modelo 33.16	-22153,36
Modelo 33.18	-22056,05
Modelo 33.44	-22045,13

Si se compara la energía DOPE de los modelos generados por refinamiento de bucle con la energía del modelo precursor (Modelos 3, 22, 24 y 33) se observa una notable disminución de los niveles energéticos, lo que indica que a simple vista, todos los modelos generados por

refinamiento constituyen mejores modelos tridimensionales de la proteína blanco que el modelo que se utiliza como base. Sin embargo, además de las consideraciones energéticas, se debe tener en cuenta la esteroquímica de los modelos. Todos los modelos presentados en la Tabla 5 fueron analizados con el programa PROCHECK. En la siguiente tabla se presenta un resumen de las principales características evaluadas por este programa y los resultados obtenidos por los modelos en cada una de ellas.

Tabla 6: Resumen de evaluación entregada por PROCHECK para los primeros 6 modelos obtenidos por refinamiento de bucles.

	Modelo 3.3	Modelo 3.30	Modelo 3.50	Modelo 22.17	Modelo 22.20	Modelo 22.48
Gráfico de Ramachandran						
Aa en regiones altamente permitida	91,80%	93,30%	93,30%	92,90%	92,60%	91,40%
Aa en de regiones moderadamente permitidas	6,30%	4,50%	4,50%	5,90%	6,70%	6,30%
Aa en de regiones poco permitidas	1,90%	1,90%	2,20%	1,10%	0,70%	1,10%
Aa en regiones no permitidas	0%	0,40%	0%	0%	0%	1,10%
Parámetros de la cadena principal						
Mejor de lo esperado	3	3	3	3	3	3
Dentro de lo esperado	3	3	3	3	3	3
Peor que lo esperado	0	0	0	0	0	0
Parámetros de las cadenas laterales						
Mejor de lo esperado	5	5	5	5	5	5
Dentro de lo esperado	0	0	0	0	0	0
Peor que lo esperado	0	0	0	0	0	0
Propiedades de los residuos						
Desviación máxima sobre valor esperado	18,5	18,5	18,5	15,2	15,2	15,2
Ángulos / Largos de Enlace	6,1	6	8,1	5,6	6,6	7,6
Malos contactos entre átomos	22	24	19	9	10	8
Factores G						
Dihedrales	-0,01	0,01	0,01	0	0	0
Covalentes	-0,14	-0,11	-0,12	-0,13	-0,11	-0,12
Totales	-0,05	-0,03	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04
% dentro de lo esperado						
Largos de enlace de la cadena principal	90%	91,90%	89,20%	92,60%	95,20%	92,80%
Ángulos de enlace de la cadena principal	75,80%	77,20%	77,20%	76,20%	72,90%	78,20%
Planaridad del enlace	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Aminoácidos con problemas en los gráficos Chi1-Ch2.						
	Leu 55	Ile 248	Leu 55	Arg 104	Arg 104	Arg 104
	Leu 187	Leu 55	Leu 187	Arg 181	Arg 181	Arg181
	Leu 129	Leu 187	Leu 129	Ile 169	Ile 284	Ile 169
	Leu 151	Leu 129	Leu 151		Ile 169	Trp 256
	Leu 173	Leu 151	Leu 173			
	Trp 356	Leu 117	Leu 29			
	Gln 227	Leu 29	Leu 103			
	Leu 125	Leu 103	Leu 35			
	Leu 10	Leu 173	Leu XX1			
	Leu XX1	Leu 35	Leu XX2			
	Leu XX2	Leu XX1				
	Leu XX3					
Aminoácidos involucrados en distorsiones geométricas						
Largo de enlace	*****	*****	Phe257-Glu258	Ile 253-Lys254	*****	Glu230-Val231
Ángulo de enlace	Gln9-Leu10	Leu10-Pro11	Gln200-Ala201	Phe257-Glu258	Phe257-Glu258	Ala 251
	Leu10-Pro11	Gln200-Ala201	Asp219-Arg220			Val 279
	Gln200-Ala201		Glu247-Ile248			

Tabla 7: Resumen de la evaluación entregada por PROCHECK para los últimos 6 modelos generados por modelamiento de bucles.

	Modelo 24.4	Modelo 24.7	Modelo 24.47	Modelo 33.16	Modelo 33.18	Modelo 33.44
Gráfico de Ramachandran						
Aa en regiones altamente permitida	90,30%	88,10%	89,20%	90%	90,70%	89,60%
Aa en de regiones moderadamente permitidas	7,10%	9,30%	8,60%	8,60%	8,60%	9,30%
Aa en de regiones poco permitidas	1,90%	1,90%	1,50%	1,50%	0,70%	1,10%
Aa en regiones no permitidas	0,70%	0,70%	0,70%	0%	0%	0%
Parámetros de la cadena principal						
Mejor de lo esperado	3	3	3	3	3	3
Dentro de lo esperado	3	3	3	3	3	3
Peor que lo esperado	0	0	0	0	0	0
Parámetros de las cadenas laterales						
Mejor de lo esperado	5	5	5	5	5	5
Dentro de lo esperado	0	0	0	0	0	0
Peor que lo esperado	0	0	0	0	0	0
Propiedades de los residuos						
Desviación máxima sobre valor esperado	12	12	12	19,2	19,2	19,2
Ángulos / Largos de Enlace	7,3	5,7	5,7	6,9	9,5	6,9
Malos contactos entre átomos	12	13	14	6	10	6
Factores G						
Dihedrales	0,03	0	0,01	-0,08	-0,09	-0,09
Covalentes	-0,12	-0,1	-0,14	-0,19	-0,22	-0,19
Totales	-0,02	-0,03	-0,04	-0,12	-0,13	-0,1
% dentro de lo esperado						
Largos de enlace de la cadena principal	93,70%	95,30%	95%	88,70%	86,80%	87,80%
Ángulos de enlace de la cadena principal	78,20%	80,20%	76,40%	72,50%	71,40%	71,50%
Planaridad del enlace	100%	100%	100%	96%	100%	3,40%
Aminoácidos con problemas en los gráficos Chi1-Ch2.						
	Arg 30	Arg 30	Arg 30	Ile 206	Ile 206	Ile 206
	Gln 90	Gln 90	Gln 90	Ile 242	Ile 242	Ile 242
	Gln 265	Gln 265	Gln 265	Leu 55	Leu 55	Leu 55
	Ile 169	Ile 169	Ile 169	Leu 35	Leu 35	Leu 35
	Ile 242	Ile 206	Ile 206	Leu 125	Leu 125	Leu 125
	Ile 206	Ile 242	Ile 242		Trp 256	Trp 256
	Leu 35	Leu 35	Leu 202			
	Leu 202	Leu 74	Leu 74			
	Leu 74	Leu 202	Leu 35			
	Met 56	Met 56	Met 56			
Aminoácidos involucrados en distorsiones geométricas						
Largo de enlace	*****	****	****	Thr287	Thr287	
Ángulo de enlace	Gln200-Ala201	Gln200-Ala201	Leu10-Pro11	Gln200-Ala201	Gln200-Ala201	
	Gln250	Ile 253	Gln200-Ala201		Asp219-Arg220	
	Ser278-Val279	Gly255	Met228		Trp256-Phe257	
	Val279		Met228-Clu229			
	Ile 284					

La evaluación de PROCHECK se basa en la comparación de valores de ciertas propiedades calculados a partir de la estructura modelada a evaluar, con valores típicos para las mismas obtenidos del análisis de 118 estructuras tridimensionales adquiridas mediante difracción de rayos X con una resolución de al menos 2,0 Å.

Considerando los resultados de la evaluación, se determina que los mejores modelos obtenidos fueron los generados por el refinamiento de bucles aplicado sobre el Modelo 22 (Modelo 22.17, Modelo 22.20 y Modelo 22.48). Esto se basa, principalmente, en las siguientes razones:

- Presentan alrededor de un 92 % de sus aminoácidos en configuraciones altamente probables en el gráfico de Ramachandran, y ninguno en una zona no permitida.
- Poseen pocos malos contactos entre átomos cercanos.
- Existen pocos aminoácidos presentando problemas en los gráficos de los ángulos Chi1-Ch2.
- Y finalmente, se observa un pequeño número de distorsiones geométricas en los largos y ángulos de enlace de la cadena principal.

Los gráficos de Ramachandran para los modelos seleccionados se pueden revisar en el Anexo IX.

Los modelos 22.17 y 22.20 presentan sólo cinco aminoácidos que no se encuentran en dentro de las zonas probables definidas por Ramachandran, de estos tres corresponden a glicinas, aminoácido que por su pequeño tamaño puede adoptar conformaciones que violen los límites, sin que esto signifique errores en el modelo. Los otros dos aminoácidos con conformaciones discutibles son el Ácido Glutámico 247 y la Glutamina 200 para el modelo 22.17 y Triptofano 256 y Glutamina 200 para el modelo 22.20.

El modelo 22.48 presenta siete aminoácidos problemas según el gráfico de Ramachandran, de los cuales dos corresponden a glicinas y el resto son la Glutamina 200, Alanina 251, Ácido Glutámico 247, Ácido Glutámico 223 y Treonina 281.

La Glutamina 200 aparece con problemas en los tres modelos, este error puede explicarse por el hecho de que en el alineamiento, éste aminoácido se encuentra alineado con una alanina. Es probable que las diferencias en tamaño entre los aminoácidos impidan que la Glutamina 200 adopte una configuración similar a la de la alanina del templado. Algo similar ocurre con la Ácido Glutámico 247 cuya posición en el alineamiento corresponde a una serina, sin embargo se destaca que este conflicto no ocurre en el modelo 22.20. Los problemas con la Alanina 251, Ácido Glutámico 223 se explican por motivos de tamaño al igual que los anteriores.

Por su parte, el error en el aminoácido Triptófano 256 es comprensible ya que corresponde al segundo aminoácido del templado secundario utilizado. En general, estas zonas suelen presentar este tipo de conflictos.

Dados los análisis anteriores se estima que los modelos 22.17 y 22.20 presentan mayores probabilidades de representar el modelo tridimensional de la proteína ApoE.

En la Figura 12 se presenta la superposición de los modelos seleccionados. Se puede ver que sólo se diferencian en los bucles sometidos a refinamiento. En rosado se muestra el modelo 22.17 y en verde el modelo 22.20.



Figura 12: Superposición de los modelos 22.17 y 22.20

3.3 Sistema de dos fases acuosas.

Como se describe en el Capítulo 2.4.2, se construyó la curva binodal para el sistema PEG 1000-Fosfato a pH 7.0 y temperatura ambiente, a partir de la mezcla y dilución de soluciones stock para determinar las composiciones a las que ocurre la separación del sistema en dos fases inmiscibles. La curva así obtenida se presenta en la Figura 13.

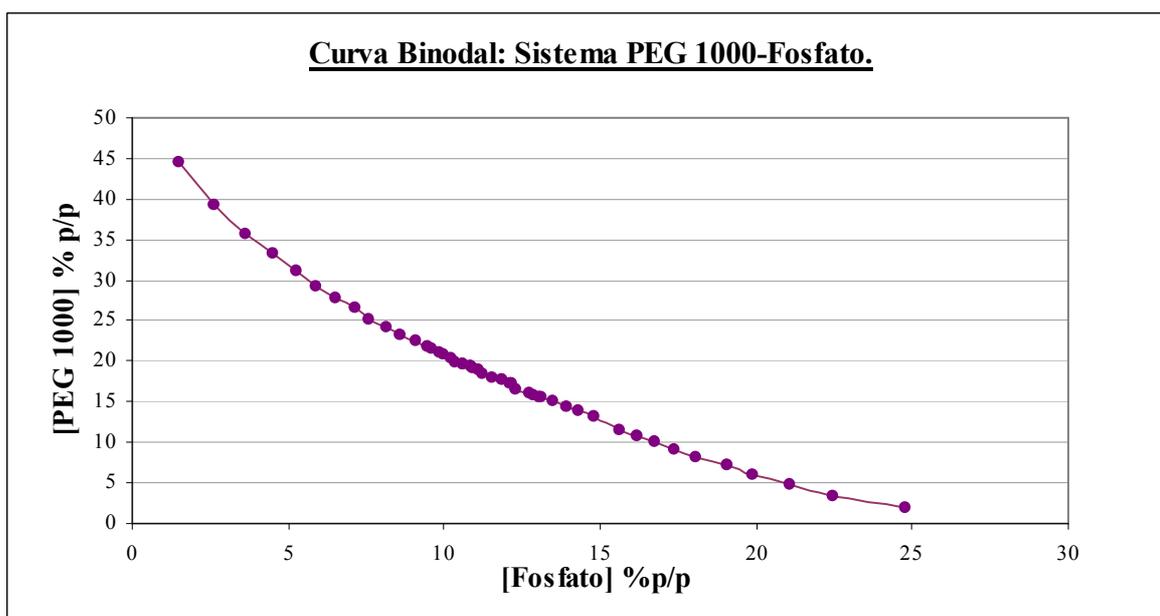


Figura 13: Curva Binodal obtenida para el sistema PEG 1000 - Fosfato a pH 7.0 y temperatura ambiente.

El ajuste de la curva binodal experimental al modelo de Mistry (Ecuación 5) se realizó mediante la minimización del error cuadrático medio, obteniéndose la siguiente ecuación:

Ecuación 12

$$Y = \exp(4,211 - 0,334 \cdot X^{0,5} - 1,17 \cdot 10^{-4} \cdot X^3)$$

La correlación obtenida para este modelo es de $R^2=0,9995$.

Luego, según lo descrito en la metodología, se construyeron una serie de líneas de equilibrio al azar, para encontrar el punto de fuga del sistema. Para esto se estimó un punto promedio de intersección entre las *tie lines* representativas del sistema. En la Figura 14 se presentan las líneas de equilibrio y el punto de intersección estimado.

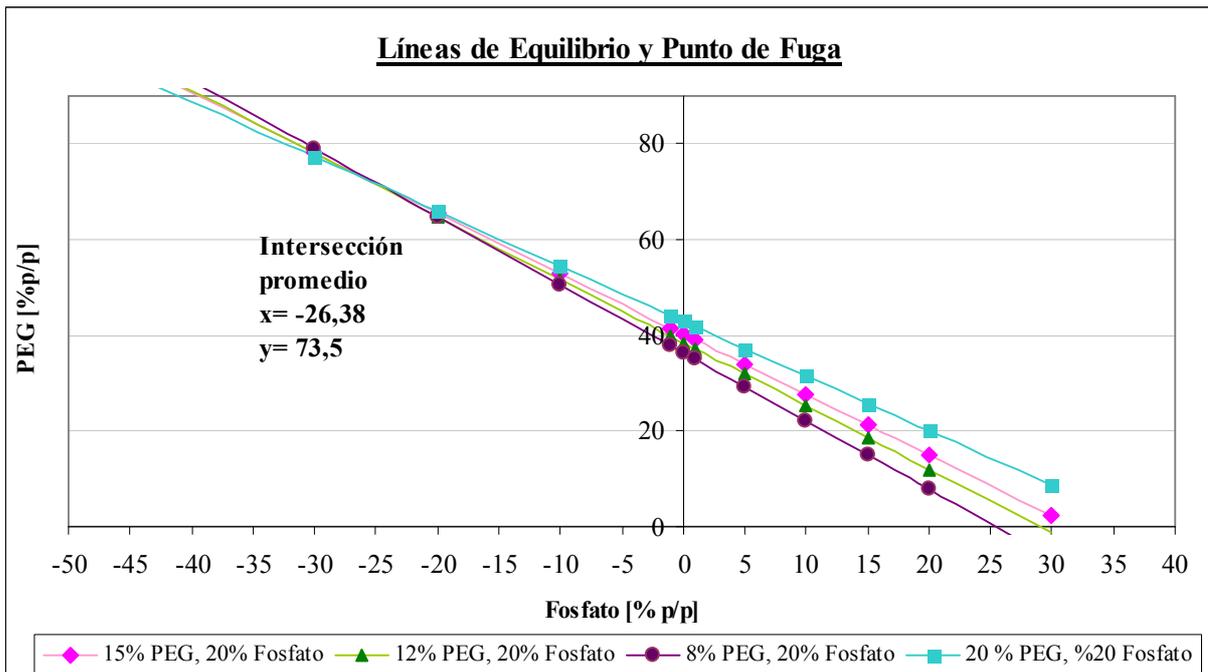


Figura 14: Líneas de equilibrio representativas del sistema en estudio. Se aprecia el punto de fuga del sistema.

Utilizando el punto de intersección previamente determinado, se resuelve el sistema de ecuaciones presentado en la metodología y se obtiene la ecuación de una línea de equilibrio teórica cuyo largo es de 45. La ecuación de esta recta es:

Ecuación 13

$$Y = -1,2644 \cdot X + 40,287$$

Donde Y representa la concentración en % p/p de PEG 1000 y X la concentración en % p/p de Fosfato. Dado que no se pretende trabajar con alguna razón de volúmenes entre las fases específicas, se elige una concentración de fosfato global arbitraria y utilizando la ecuación de la línea de equilibrio teórica se obtiene la concentración de PEG 1000 que entrega un sistema con largo de la línea de equilibrio de 45. Si se escoge una concentración de fosfato de 20% p/p, se requiere de un concentración de 14,999 %p/p de PEG 1000.

Para comprobar lo anterior, se construyó un sistema de dos fases acuosas con composición global de 15% p/p de PEG 1000 y 20% p/p de Fosfato. La Tabla 8 presenta la comparación entre las composiciones de las fases superior e inferior obtenidas teórica y experimentalmente.

Tabla 8: Comparación de la composición teórica y experimental de las fases superior e inferior para un sistema formado por 15% p/p PEG 1000 y 20% p/p Fosfato.

Concentración % p/p	Teórica	Experimental	% Diferencia
Fosfato fase inferior	31,498	31,664	-0,528
Fosfato fase superior	3,595	3,513	2,269
PEG1000 fase inferior	0,269	0,253	6,105
PEG1000 fase superior	35,574	35,845	-0,762

Se puede apreciar que los porcentajes de diferencia en base del valor teórico, son bastante bajos. Esto valida que las líneas de equilibrio y el punto de fuga determinados experimentalmente son representativos del sistema en estudio.

Dados los resultados anteriores y la información entregada, se determinó que la composición global del sistema de dos fases acuosas y las condiciones de operación a utilizar en la primera etapa del proceso de separación son las siguientes:

- 15% p/p de PEG 1000.
- 20% p/p de Fosfato.
- 10% p/p de Suero de rata.
- pH 7.0 (aproximadamente)
- Temperatura ambiente. (20°C)

Se construyeron cinco sistemas homólogos compuestos por dos sistemas de dos fases acuosas, uno con muestras de suero de rata concentrado (ie. muestra original recolectada desde las ratas) y uno con suero diluido. Cada sistema ATPS poseía una masa total de 5 gramos, lo que permitía el ajuste de su pH, sin embargo la rápida separación de las fases y la formación de una interfase viscosa, dificultó la medición. Los resultados presentados a continuación corresponden a una muestra representativa de todos los resultados obtenidos.

En la Figura 15 se muestra una fotografía de uno de los sistemas realizados. Se aprecia la formación de una interfase blanquecina cuyo espesor, bajo inspección visual, parece ser proporcional a la cantidad de la muestra aplicada al sistema. El sistema D fue preparado con la muestra de suero diluido y el sistema C, con la muestra concentrada.

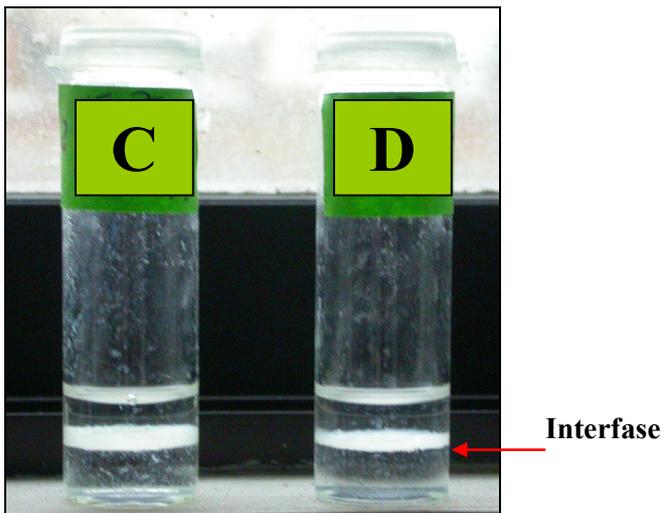


Figura 15: Fotografía de los sistemas de dos fases acuosas contruidos.

Las dos fases se formaron en pocos minutos, sin embargo la clarificación de cada una de ellas requirió de al menos toda una noche. Dicha clarificación, se asocia a la formación de la interfase blanquecina. Dado que se desconoce la composición de la interfase, no se puede discriminar si la demora en su separación es esperable o no. Cabe mencionar, que durante las primeras experiencias, no se espero tanto tiempo y sin embargo, se obtuvo el mismo patrón de migración de las proteínas, por lo tanto si la fase de interés corresponde a la fase superior o inferior, no es necesario esperar tanto tiempo.

La concentración de proteínas presente en cada una de las muestras a cargar en el gel fue cuantificada por el método de Bradford modificado. Para estimar la concentración de cada fase $[C_{fase}]$, se utilizó la concentración medida de las muestras cargadas al gel $[C_{gel}]$ y los volúmenes de muestra tomada $[V_{muestra}]$ y de resuspensión $[V_{resuspensión}]$ luego de la precipitación con TCA.

Ecuación 14

$$m_p = [C_{gel}] * V_{res}$$

Ecuación 15

$$[C_{fase}] = \frac{m_p}{V_{muestra}}$$

Donde m_p corresponde a la masa de proteína precipitada. La concentración de cada fase así obtenida, sólo se considera una estimación dado que podrían existir pérdidas de proteína asociada a la precipitación con TCA.

Para las muestras de interfase, la cantidad de proteína precipitada se calculó sumando los valores obtenidos para el *pellet* y para el sobrenadante

En la Tabla 9 se presenta el resultado obtenido para cada fase.

Tabla 9: Estimación de la concentración de proteína presente en las fases del sistema de dos fases acuosas. (c) indica que la fase pertenece al sistema con suero concentrado y (d) indica que la fase pertenece al sistema con suero diluido. ND: No determinado.

Muestra	Volumen de resuspensión	Concentración resuspensión	Masa de proteína resuspendida	Volumen de muestra	Concentración fase
	[mL]	[mg/mL]	[mg]	[mL]	[mg/mL]
Fase superior (c)	0,500	0,350	0,1750	0,100	1,750
Fase superior (d)	0,500	0,029	0,0146	0,100	0,146
Fase inferior (c)	0,200	0,042	0,0084	0,100	0,084
Fase inferior (d)	0,200	0,010	0,0020	0,100	0,020
Interfase (c)	ND	ND	0,0956	0,200	0,478
Interfase (d)	ND	ND	0,0228	0,200	0,114

Se observa claramente que la fase superior de ambos sistemas es la que presenta una mayor concentración de proteína.

Comparando las concentraciones obtenidas para todas las fases de ambos sistemas, se aprecia que las concentraciones del sistema con suero diluido son más bajas de lo esperadas, ya que sólo se realizó una dilución 1:2 de las proteínas séricas.

Para analizar la variedad de proteínas presentes en cada fase y verificar si existe o no una migración selectiva entre las fases, se realizó un gel de SDS-PAGE.

La realización de la electroforesis presentó algunos problemas, principalmente debido a la presencia remanente de PEG-1000 y sales precipitadas que alteran la migración de las proteínas y la calidad del gel obtenido. Ejemplo de esto, son las líneas verticales que se ven en la Figura 16, que muestra el gel obtenido para uno de los sistemas construidos.

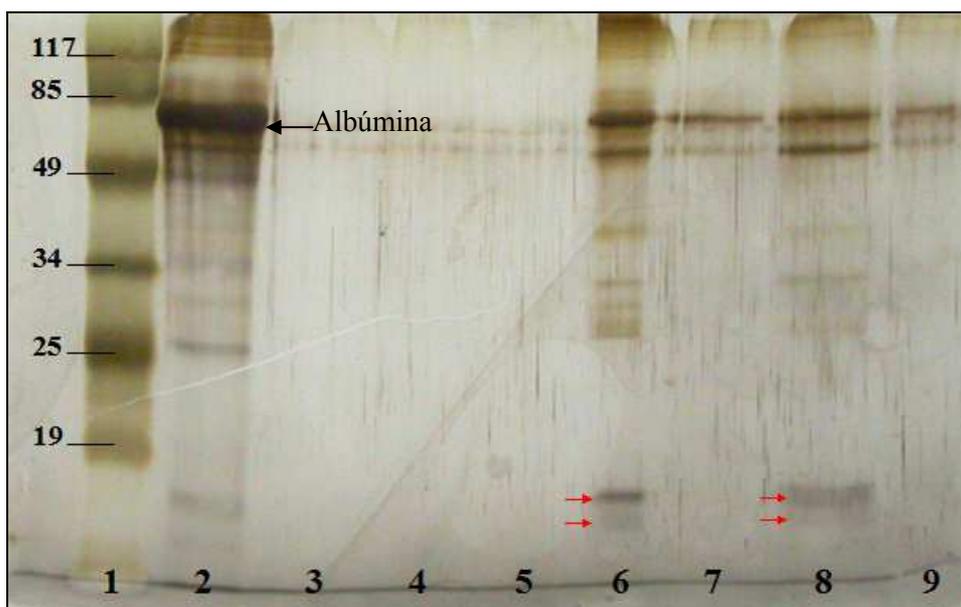


Figura 16: Gel 12,5% SDS-PAGE. Composición de las fases formadas en el sistema de dos fases acuosas.

1) Marcador de peso molecular, 2) Fase superior muestra suero concentrada, 3) Fase superior con muestra de suero diluida, 4) *Pellet* de interfase del sistema con muestra de suero concentrada, 5) *Pellet* de interfase del sistema con suero diluida, 6) Sobrenadante de interfase del sistema con suero concentrado, 7) Sobrenadante de interfase de sistema con suero diluido, 8) Fase inferior sistema con suero concentrado, 9) Fase inferior sistema con suero diluido.

Nota: La muestra de fase superior cargada en el carril 3 no presenta ninguna banda. Esto se debe posiblemente a la pérdida del *pellet* de proteína durante el procedimiento de precipitación con TCA, ya que en el análisis de sistemas similares realizados no se presenta este comportamiento.

Se observa que la fase superior presenta bandas de mayor intensidad que las asociadas a las otras fases, a pesar de encontrarse diluida alrededor de 5 veces. Esto indica que la mayoría de las proteínas plasmáticas migran hacia la fase orgánica. Sin embargo, esta migración es sólo relativamente selectiva, ya que es posible observar las mismas bandas de gran intensidad presentes en la fase superior, en la fase inferior del sistema pero con una menor intensidad. Esto se aprecia con gran claridad al observar los carriles 2 y 8.

La principal disminución de intensidad ocurre en la banda cercana a los 70 kDa. Es altamente probable que ésta corresponda a la proteína albúmina ya que su peso molecular reportado es de 66 kDa aproximadamente y además se sabe que esta proteína es una de las mayoritarias dentro de la composición del plasma, por lo tanto es esperable una gran intensidad de su banda. Otra remoción de contaminantes importante tiene que ver con las proteínas de alto peso molecular presentes en el suero. Para analizar la presencia de estas proteínas en cada una de las fases se realizó un gel de poliacrilamida al 5%, capaz de separar proteínas de hasta 205 kDa, cuyos resultados se discuten más adelante.

Las bandas indicadas con flechas rojas corresponden a proteínas con peso molecular cercano al esperado para la Transtiretina (13 kDa la banda superior y 12 kDa la banda inferior aproximadamente). Si bien estas bandas se encuentran presentes tanto en la fase superior como en la inferior, se destaca el hecho que esta última posee una menor concentración de proteína, por lo tanto si alguna de las bandas corresponde a la proteína de interés, se tendría la proteína objetivo en una suspensión mucho menos contaminada que en la muestra de suero original y que en la fase superior. No se puede asegurar con exactitud que una de las bandas indicadas corresponda a Transtiretina, ya que se ha reportado la existencia en el plasma de rata de más de 275 proteínas y péptidos con pesos moleculares entre 3 y 225 kDa, de las cuales, más de 50 presentan pesos moleculares menores que 25 kDa (Linke T. y otros 2006).

Finalmente, con respecto a la interfase formada se puede mencionar que el *pellet* obtenido desde esta muestra presenta una concentración de proteína muy baja, tanto es así que sólo es posible visualizar dos tenues bandas que probablemente corresponden a restos de proteínas plasmáticas abundantes adheridas a las fibras de interfase. Por su parte, los sobrenadantes presentan una composición proteica similar a la fase superior, de donde se deduce que la toma de muestras de interfase no es completamente efectiva ya que se colecta parte de la fase superior, que luego durante la centrifugación de la muestra vuelve a separarse.

En la Figura 17 se presenta el gel al 5% de acrilamida realizado para el análisis de la posible presencia de proteínas de alto peso molecular en cada fase.

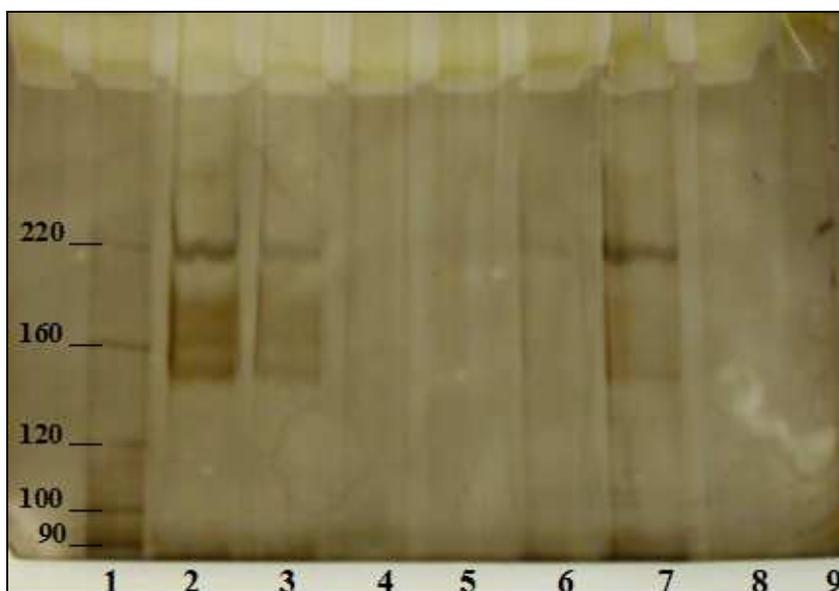


Figura 17: Gel 5% SDS-PAGE. Composición de las fases del sistema ATPS. 1) Marcador de peso molecular, 2) Fase superior, sistema con suero concentrado, 3) Fase superior, sistema con suero diluido, 4) *Pellet* de interfase, sistema con suero concentrado, 5) *Pellet* de interfase, sistema con suero diluido, 6) Sobrenadante de interfase, sistema con suero

diluido, 7) Sobrenadante de interfase, sistema con suero concentrado, 8) Fase inferior, sistema con suero concentrado, 9) Fase inferior, sistema con suero diluido.

Se observa claramente la presencia de proteínas de peso molecular entre los 220 kDa y los 160 kDa en las muestras de fase superior y en el sobrenadante de las muestras de interfase del sistema realizado con suero concentrado. Por su parte, la fase inferior se encuentra completamente libre de estas proteínas, ratificando el hecho de que la obtención de esta fase se presenta como una posible metodología para obtener la proteína de interés con un significativamente menor número y concentración de contaminantes.

3.4 Cromatografía de afinidad

3.4.1 Elección de la resina y condiciones de acoplamiento del ligando

Para purificar la rTTR se considera explotar su afinidad por la hormona L-tiroxina. Dicha interacción ubica el extremo OH de la tiroxina en el interior del bolsillo de unión de la proteína, descrito en el Capítulo 1.1.1.

La selección de la resina a utilizar consideró la necesidad de un brazo espaciador, debido a la estereoquímica de la interacción, y que el grupo reactivo disponible para la unión del ligando tuviera afinidad por los grupos $-NH$. Así, se seleccionó la resina comercial llamada *Epoxy-activated Sepharose 6B*, que posee un brazo espaciador de 12 átomos en cuyo extremo se encuentra el grupo reactivo epoxi. La alternativa que se consideró corresponde a la resina *Cyanogen bromide activated Sepharose 4B*, la cual fue descartada por no poseer brazo espaciador, sin embargo podría haber sido utilizada de realizar una reacción previa que permitiera acoplar el brazo espaciador, ya sea a la resina o al ligando. Dado que esto implicaba una etapa extra en el proceso, se descartó.

El grupo epoxi es capaz de reaccionar, mediante la formación de distintos enlaces, con grupos nucleofílicos como OH, NH y SH cuando se encuentra en un ambiente básico (pH 9-13). Mientras más básico es el pH de reacción, más favorable es la unión entre el grupo epoxi y el grupo OH y a medida que disminuye se van favoreciendo las reacciones con los grupos NH y SH.

Así para favorecer la unión de interés (epoxi-NH) se determinó llevar a cabo la reacción de acoplamiento a pH 9,7.

Según las especificaciones del fabricante de la resina, la reacción de acoplamiento debe ser llevada a cabo en un medio acuoso, sin embargo dada la baja solubilidad del ligando en este tipo de medios, se presentó la necesidad de incorporar en el buffer de acoplamiento algún solvente orgánico en el que la tiroxina fuera soluble. La concentración final de solvente orgánico a utilizar, se encuentra limitada por la resistencia que posee la resina cuando es expuesta a este tipo de

compuestos. Las especificaciones técnicas de la resina, indican como concentración máxima de solvente un 50% v/v. Así, se decidió utilizar el compuesto dimetilsulfóxido (DMSO) dadas sus excelentes propiedades como solvente, a la máxima concentración permitida y, en la mayoría de los casos, buffer fosfato, el que luego fue reemplazado por buffer borato obteniéndose una mejor solubilidad del ligando.

Para comprobar el acoplamiento del ligando a la resina, se intentó medir la absorbancia del buffer de acoplamiento antes y después de la reacción, procedimiento que presentó una serie de dificultades debido a la turbiedad de las muestras. A pesar de esto, se obtuvieron un par de medidas aproximadas que revelaron la adsorción de casi todo el ligando aplicado a la resina. (Abs inicial $\approx 2,5$, Abs final $\approx 0,1$).

3.4.2 Cromatografías realizadas

Siguiendo las condiciones de operación seleccionadas que se indican en los Capítulos 2.5.4 y 2.5.5 se llevaron a cabo ocho experiencias cromatográficas. A continuación se presenta un resumen de las diferencias existentes entre las cada una de ellas.

Tabla 10: Resumen de experiencias cromatográficas realizadas.

Cromatografía	Identificación de resina utilizada	Tipo de muestra aplicada	Volumen de muestra [mL]	Incubación	Agitación por inmersión en lavados y etapa de equilibrio, de 5 minutos
1	Resina 1	A	0,380	No	No
2	Resina 1	A	0,365	No	No
3	Resina 1	A	0,900	Triple aplicación	No
4	Resina 1	A	0,900	1 hora	Si
5	Resina 2	A	0,900	1 hora	Si
6	Resina 3	A	0,880	0,5 horas	Si
7	Resina 4	B	2,500	5 horas	Si
8	Resina 5	B	2,500	Toda la noche	Si

Se utilizaron dos tipos de muestras durante el desarrollo del trabajo. La primera (Muestra A) corresponde muestras de suero de rata sometidas a una etapa de remoción de albúmina. La finalidad del uso de esta muestra era asegurarse de la presencia de rTTR en la muestra aplicada a la columna. La remoción de albúmina permite eliminar abundante proteína contaminante desde la muestra a tratar facilitando la visualización de proteínas menos abundantes en los geles de SDS-PAGE a realizar posteriormente.

La segunda muestra (Muestra B) corresponde a muestras de la fase inferior del sistema ATPS seleccionado, que se postula como una primera etapa en el proceso de purificación de rTTR.

En las siguientes figuras se reportan los resultados más representativos obtenidos.

Descripción de muestras aplicadas a la columna

Muestra A:

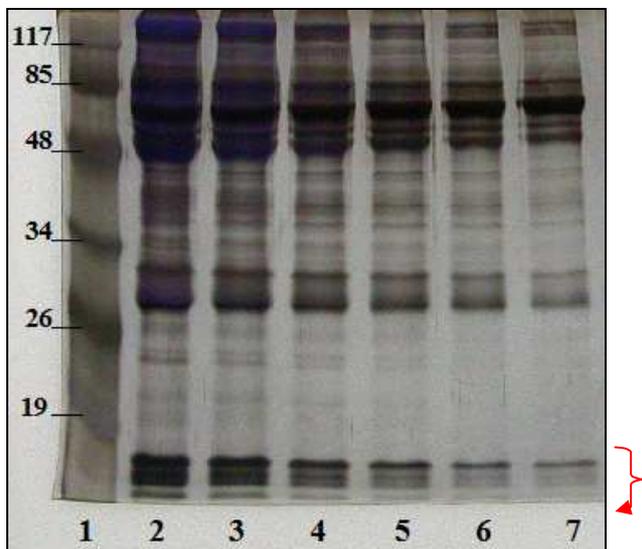


Figura 18: SDS-PAGE de muestras de lavados sucesivos de la columna de inmunoafinidad para la remoción de albúmina. 1) Marcador de peso molecular; 2) Primera colección; 3) Lavado 1; 4) Lavado 2; 5) Lavado 3; 6) Lavado 4; 7) Lavado 5 .

La figura anterior presenta el SDS-PAGE realizado a las muestras obtenidas de los lavados de la columna de inmunoafinidad de remoción de albúmina. Se destaca la presencia de cuatro bandas de peso molecular inferior a 19 kD, zona donde debería encontrarse la rTTR (PM 13 kDa). Esto queda claro al observar el carril 4, donde dado que existe menos proteína en la muestra, se logran distinguir las bandas mencionadas. Esto permite plantear como hipótesis que las muestras cargadas en la columna de afinidad contienen la proteína de interés. No se puede estimar el peso molecular de las bandas debido a que se encuentran fuera del rango del marcador de peso molecular, sólo se puede asegurar que poseen un peso inferior a 19 kDa.

Muestra B

Para obtener la muestra de fase inferior a utilizar en la cromatografía de afinidad, se construyó el sistema de dos fases acuosas determinado en el Capítulo 3.3 con una masa total de 15 gramos. Luego para verificar la presencia de una posible banda asociada a rTTR se realizó una electroforesis denaturante con 200 μ L de muestra, previamente precipitada con TCA. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 19.

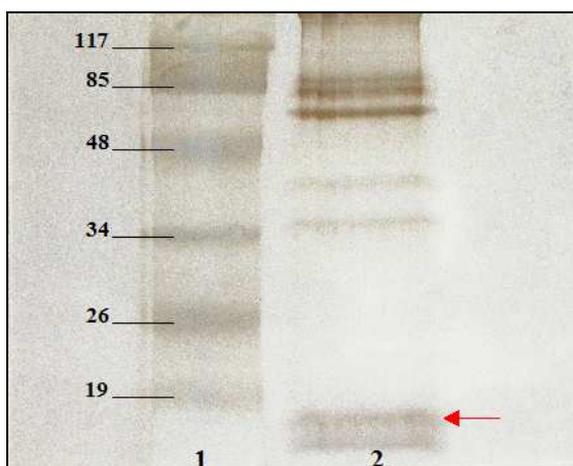


Figura 19: SDS-PAGE obtenido para la muestra de fase inferior a ser aplicada en la columna de afinidad con tiroxina. 1) Marcador de peso molecular; 2) Fase inferior.

Indicadas con una flecha roja se destacan dos bandas con peso molecular inferior a 19 kDa. Al igual que en la figura anterior, se espera que alguna de estas bandas corresponda a la proteína de interés. Si bien no aparecen cuatro bandas como en la Figura 18 anterior, no puede descartarse la presencia de las proteínas asociadas a las otras dos bandas en la fase, debido que podrían encontrarse muy diluidas por lo que no son detectadas en el gel.

SDS-PAGE de fracciones de elusión y lavado de cromatografías realizadas con Muestra A.

La visualización de los resultados obtenido en las cromatografías realizadas con las muestras A se presentan a continuación. No se consideraron los resultados obtenidos para las cromatografías 1 y 2 por haberse realizado con muy poca proteína como para ser concluyentes.

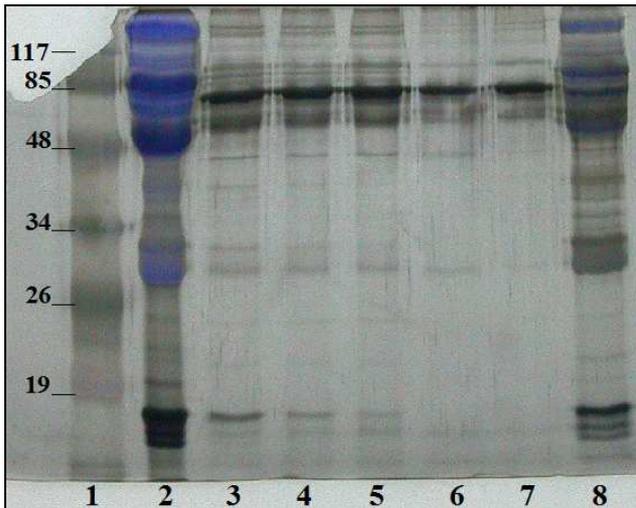


Figura 20: Gel de SDS-PAGE obtenido para la cromatografía 3. 1) Marcador de peso molecular; 2) 1° muestra colectada desde la columna; 3) al 7) Muestras de Lavado 2°, 3°, 4°, 5° y 6°; y 8) Muestra de lavado 1°.

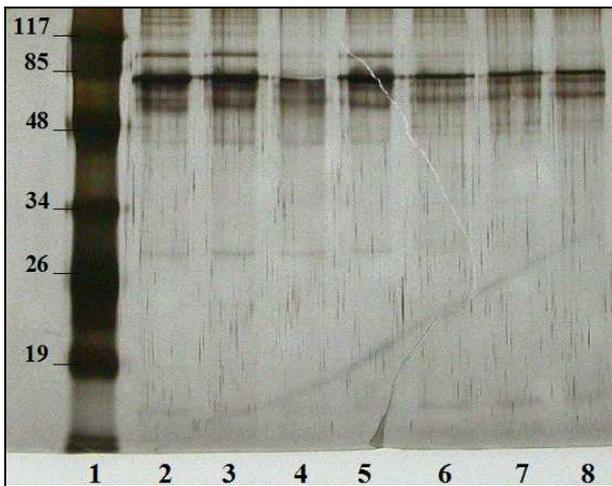


Figura 21: Gel SDS-PAGE obtenido para cromatografía 3. 1) Marcador de peso molecular; 2) al 5) Muestras de lavado 7°, 8°, 9° y 10°; 6) al 8) Muestras de elución a pH 6,0 1°, 2° y 3°.

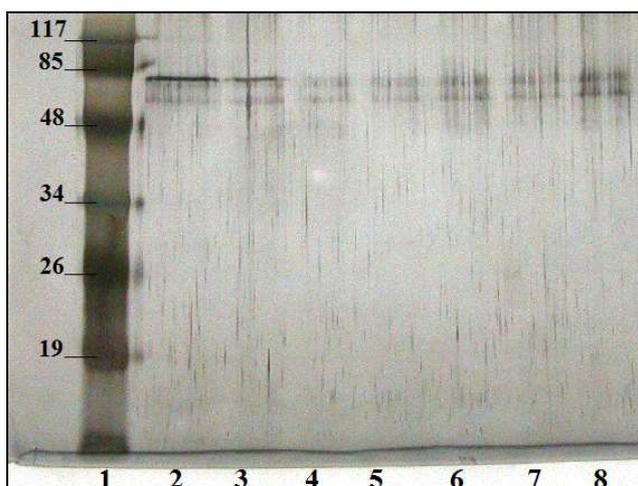


Figura 22: Gel SDS-PAGE obtenido para muestras de la cromatografía 3. 1) Marcador de peso molecular; 2) y 3) 4° y 5° eluciones a pH 6,0; 4) al 8) Eluciones a pH 5,0.

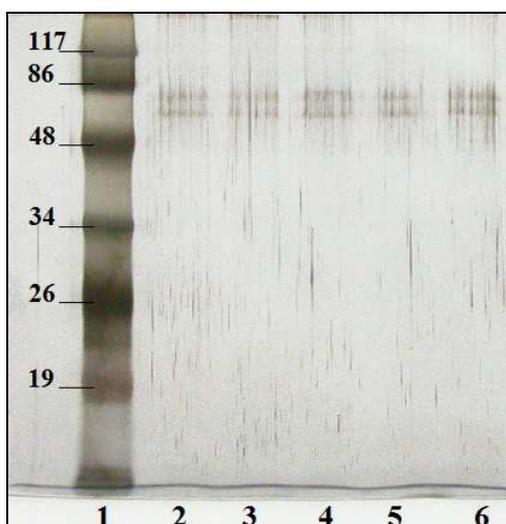


Figura 23: Gel SDS-PAGE obtenido para la cromatografía 3. 1) Marcador de peso molecular; 2) al 6) Muestras de elución a pH 4,0.

La primera muestra colectada de la columna luego de la aplicación de las proteínas y el primer lavado realizado, presentan abundantes proteínas, incluidas las cuatro bandas bajo los 19 kDa reportadas para las colecciones obtenidas desde la columna de inmunoafinidad, lo que indica que ninguna de las proteínas asociadas a las bandas que supuestamente podrían corresponder a la rTTR interactuó con la resina. La finalidad de los lavados es remover la proteína no adsorbida, y como se aprecia en las figuras anteriores, siempre permanecen presentes vestigios de dos proteínas cerca de la banda de 86 kDa, por lo que no fueron completamente efectivos.

Se esperaba que rTTR, de no aparecer en las muestras de lavado, apareciera en las muestras de elución a pH 4,0, ya que según la información recopilada a ese pH la proteína pierde su estructura cuaternaria por lo que no sería capaz de seguir adherida al ligando. Sin embargo, como se

muestra en los geles, no se reporta ninguna banda cercana al peso molecular asociado a la rTTR en las muestras de elución, salvo tal vez en los carriles 6, 7 y 8 de la Figura 21, pero dicha banda también se observa en las muestras de lavado, por lo que es muy probable que sólo pertenezca a alguna proteína cualquiera que continúa siendo eliminada por los lavados.

La ausencia de bandas en las muestras de elución a PH 5,0 y pH 4,0 es un hecho común para todas las cromatografías realizadas.

En algunas de las cromatografías se obtuvo una banda tenue de bajo peso molecular (indicada con una flecha roja) que sólo se observa en las muestras de elución a pH 6,0, como se aprecia en la siguiente figura.

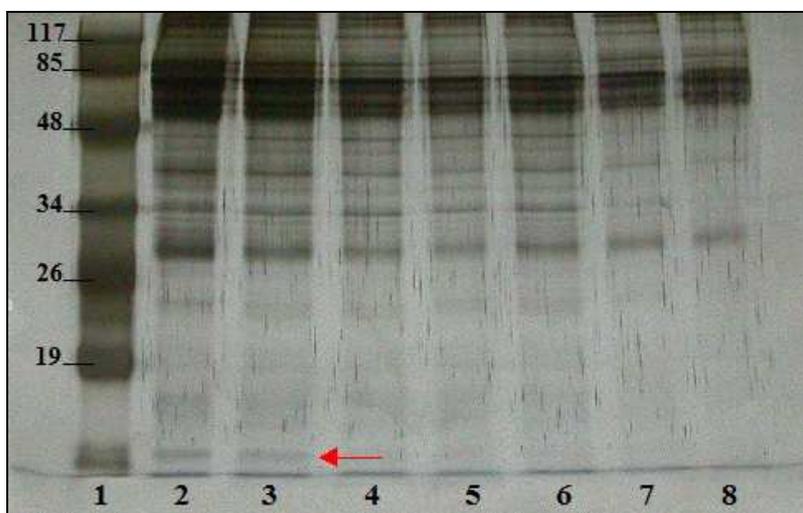


Figura 24: SDS-PAGE obtenido para muestras de cromatografía 4. 1) Marcador de peso molecular, 2) al 6) Muestras de elución a pH 6,0; 7) 1° muestra de elución a pH 5,0 y 8) 2° muestra de elución a pH 5,0.

Esta misma banda aparece también en los geles de las muestras a pH 6,0 de las cromatografías 5 (mucho más tenue, por lo tanto menos concluyente) y 6. El factor común de estas tres cromatografías es que en todas ellas la resina se incubó con la muestra problema. De comprobarse que dicha banda corresponde a la Transtiretina, se podría deducir que la interacción proteína-ligando requiere de cierto tiempo de incubación para poder formarse, probablemente atribuible a que dada la agitación, la proteína presenta mayores facilidades para acceder al ligando. Sin embargo, la elución de la supuesta proteína unida a pH 6,0 resulta inesperada, ya que la rTTR posee un punto isoeléctrico entre 5,6 y 6,0 por lo que no podría denaturarse al pH de elución. Además se ha reportado que la disgregación de la estructura cuaternaria sólo ocurre cuando se disminuye el pH hasta 4,0.

Los ensayos realizados no son lo suficientemente concluyentes para determinar si la banda que aparece en las eluciones a pH 6,0 corresponde a rTTR. Para establecer este hecho, se hace necesaria la realización de ensayos adicionales como Western Blot o Espectroscopía de masa.

SDS-PAGE de fracciones de elusión y lavado de cromatografías realizadas con Muestra B.

Por otra parte, los geles que muestran el resultado de la electroforesis para las fracciones colectadas desde las cromatografías de afinidad realizadas con muestras de suero, se detallan a continuación.

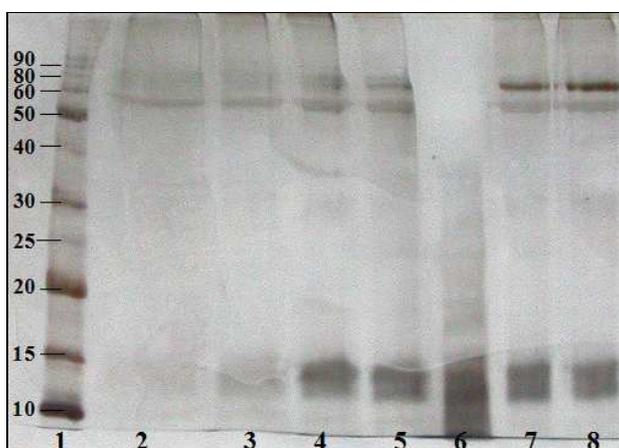


Figura 25: Gel SDS-PAGE obtenido de las fracciones colectadas de la cromatografía 7. 1) Marcador de peso molecular; 2) 1° fracción colectada; 3) al 8) Muestras de lavado 1° a la 6°



Figura 26: Gel SDS-PAGE de las fracciones colectadas de la cromatografía 7. 1) Marcador de peso molecular; 2) al 5) Muestras de lavado 7° a la 10°; 6) al 8) Primeras tres eluciones a pH 5,0.

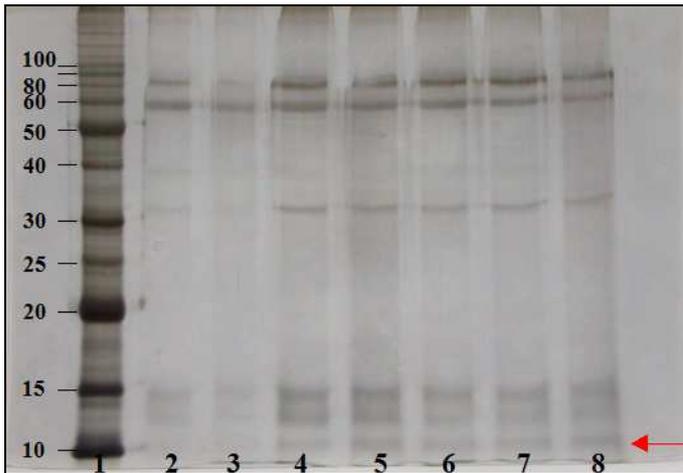


Figura 27: Gel SDS-PAGE para la cromatografía 7. 1) Marcador de peso molecular; 2) y 3) Muestras de elución a pH 5,0 4° y 5°; 4) al 8) Muestras de elución a pH 6,0.

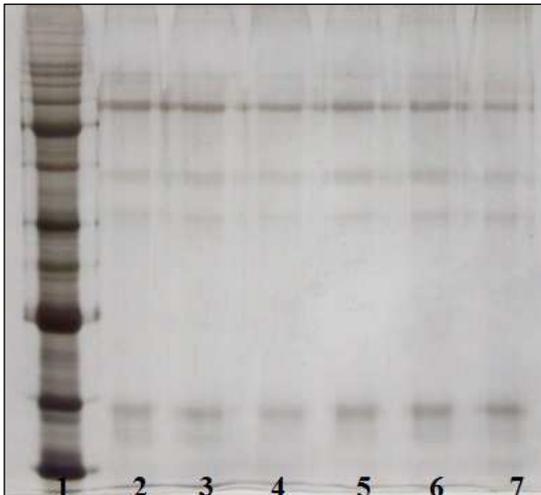


Figura 28: Último gel SDS-PAGE asociado a las muestras colectadas de la cromatografía 7. 1) Marcador de peso molecular; 2) a 6) Muestras de elución a pH 4,0; 7) Última muestra de elución a pH 6,0.

En la Figura 25 se observa que la primera colección, después de las 5 horas de incubación, presenta muy poca proteína. Este hecho se repite para la primera colección de la cromatografía 8. Este comportamiento no se apreció en ninguno de los geles realizados para las muestras A. Siendo el tiempo de incubación una de las diferencias entre los sistemas realizados con muestras A y con muestras B, esto puede atribuirse a que durante un periodo más extenso de incubación, las proteínas tienden a interactuar débilmente con la resina y por lo tanto al colectar la muestra por flujo gravitacional no son arrastradas inmediatamente, pero luego, al realizar los lavados las interacciones se debilitan permitiendo que las proteínas eluyan.

En la cromatografía 7 volvió a aparecer en las muestras de elución a pH 6,0 una banda de muy bajo peso molecular, similar a la que se presentó en algunos de los geles realizados para las cromatografías con muestras A. Esta vez aparece más nítida y claramente separada de las otras dos bandas de peso molecular bajo los 19 kDa. Además dado que se utilizó otro marcado de peso molecular, se puede estimar que el peso de la banda es de cerca de 10 kDa.

La reaparición de esta banda, fortalece la necesidad de realizar ensayos más específicos, como los ya mencionados, que permitan confirmar si dicha banda pertenece o no a rTTR, para así establecer si el sistema de purificación preliminar propuesto corresponde a una alternativa válida para la purificación de rTTR o no.

Una anomalía detectada en estos geles, radica en el hecho que las eluciones a pH 5,0 presentan un menor número de bandas y la intensidad de las que posee también es menor que las apreciadas en las eluciones a pH 4.0. Este comportamiento no se reportó en ningún gel anterior.

Los resultados obtenidos en la cromatografía 8 no se consideran representativos porque no se aprecia prácticamente ninguna diferencia entre todas las muestras de lavado y elución cargadas en el gel.

4 RECOMENDACIONES

A continuación se detallan algunas recomendaciones para trabajos posteriores y posibles modificaciones, principalmente al proceso de separación estudiado.

Sistema de dos fases acuosas:

- Utilizar una razón de volúmenes que permita disminuir el volumen de la fase inferior para concentrar las proteínas presentes en esta fase, ya que si se demuestra que rTTR permanece en parte en la fase inferior, obtenerla concentrada sería muy útil ya que permitiría una mejor detección y cuantificación.

Cromatografía de afinidad:

- Realizar análisis de Docking Molecular que permitan obtener una aproximación del largo de brazo espaciador necesario para el acoplamiento entre la tiroxina y rTTR.
- Antes de utilizar las muestras de suero, verificar que la proteína se encuentre con la conformación tridimensional adecuada, esto es como un agregado de 4 subunidades con peso molecular de aproximadamente 60 kDa.
- Aumentar alrededor de 10 volúmenes de columna los lavados de la resina para eliminar las proteínas no adheridas.
- Realizar análisis de identificación como Western Blot y Espectrometría de masa, a la posible banda asociada a rTTR, obtenida en los geles SDS-PAGE de las fracciones de cromatografía.

5 CONCLUSIONES

En general, se concluye que la caracterización de las proteínas Transtiretina (rTTR) y Apolipoproteína E (ApoE) de rata, a partir de los resultados obtenidos desde la extracción de proteínas desde un spot de gel, no fue posible ya que la baja cantidad de proteína disponible no permitió la visualización de las bandas en los geles IEF y SDS-PAGE, impidiendo la estimación del PM y pI. Sin embargo, la caracterización a partir de geles bidimensionales entregó una buena aproximación de estas propiedades, salvo para el PM de ApoE que presenta un 42% de diferencia con el valor esperado. Por otra parte, tanto los modelos disponibles, como el modelo obtenido por homología, permitieron el cálculo de la hidrofobicidad superficial de ambas proteínas.

Con respecto al estudio de un posible proceso de purificación, no se puede determinar con exactitud si las etapas de ATPS y cromatografía de afinidad utilizadas resultaron útiles. Sin embargo, los resultados obtenidos presentan indicios positivos que podrían entregar conclusiones más asertivas de ser estudiados en detalle.

De la determinación de propiedades:

El gel de isoelectroenfoque realizado con las muestras obtenidas a partir del primer método de extracción no permitió estimar el punto isoeléctrico de la Transtiretina y Apolipoproteína E de rata, ya que no fue posible visualizar bandas asociadas a dichas proteínas. Lo mismo ocurrió con el gel SDS-PAGE realizado para determinar el peso molecular.

Del análisis de los resultados, no se puede determinar con certeza si los métodos de extracción de proteínas desde trozos de gel fueron o no efectivos, principalmente debido a que la sensibilidad detectada para el método utilizado por el equipo *PhastSystem* (tanto en SDS-PAGE, 12 ng, como IEF, 180 ng) fue bastante menor que la reportada en los archivos técnicos del fabricante.

De la hidrofobicidad superficial:

La hidrofobicidad superficial promedio calculada para la Transtiretina y la Apolipoproteína E de rata fue de $0,24 \pm 0,01$ y de $0,33 \pm 0,02$, respectivamente. Ambas presentan una pequeña desviación estándar (4% y 6% respectivamente), por lo tanto se concluye que para el caso en estudio, la hidrofobicidad permanece prácticamente constante ante ligeros cambios en la estructura tridimensional.

De la modelación por homología:

Como resultado del modelamiento por homología, se obtuvo dos modelos de buena calidad a partir del refinamiento de bucles realizado sobre el modelo 22. Estos corresponden al modelo 17 y al modelo 20 presentados en el Capítulo 3.2. Si bien éstos no son los modelos que presentan una menor función de energía DOPE, poseen mejores parámetros de evaluación estereoquímicos que el resto de las estructuras construidas.

La exactitud del modelo obtenido por homología para la ApoE se considera suficiente para el cálculo de la hidrofobicidad superficial promedio de la proteína, debido principalmente a que este parámetro es relativamente poco sensible ante ligeros cambios en la estructura, como por ejemplo los que serían introducidos al realizar un refinamiento más detallado.

En caso de necesitar extraer otro tipo de información utilizando el modelo construido, se recomienda realizar un análisis detallado de la estructura aquí reportada, enfocado en las características estructurales relevantes para la información que se necesita conocer.

Del sistema de dos fases acuosas:

Se determinó la composición de uno de los sistemas de dos fases acuosas formado por PEG -1000 y Fosfato que pertenece a la línea de equilibrio con largo 45, para analizar la posible migración selectiva de las proteínas séricas entre las fases y la interfase formada.

El sistema resultó ser bastante útil para la remoción de proteínas séricas de alto peso molecular y posiblemente de albúmina. Las proteínas de alto peso (sobre 120 kDa) sólo fueron detectadas en muestras extraídas desde la fase superior del sistema ATPS. Por su parte, la probable albúmina se presenta concentrada en la fase superior, pero también es posible visualizar bandas posiblemente asociadas a ella en la fase inferior con una menor concentración. No debe descartarse como una posibilidad válida, el hecho de que las bandas remanentes asociadas a un peso molecular cercano a los 86 kDa, presentes en la fase inferior, correspondan a proteínas que se encuentran en baja concentración en el suero y con peso molecular similar al de la albúmina, lo que hace prácticamente imposible su visualización hasta que no se haya eliminado por lo menos de manera parcial la albúmina.

Dado que no se realizaron análisis más precisos para determinar qué proteína es la que está presente en cada fase, por ejemplo Wester Blot o Espectrometría de masa, no se puede establecer un patrón de migración donde se identifique cada proteína con la fase en la que está presente. Sólo es posible concluir que el sistema de dos fases acuosas formado por 15% de PEG-1000, 20% de Fosfato y 10% de muestra, pH 7,0, se presenta como una potencial herramienta para disminuir la concentración de dos grupos de proteínas plasmáticas, uno caracterizado por un peso molecular superior a los 120 kDa y el segundo grupo con peso molecular cercano a los 86 kDa,

de manera económica y simple. Además, se puede considerar un proceso reproducible, ya que los resultados mencionados anteriormente se observaron en todos los sistemas de dos fases contruidos.

Con respecto a la presencia de Transtiretina en la fase inferior con menor concentración de proteínas, no se posee la información suficiente como para declarar con certeza que alguna de las bandas con pesos moleculares inferiores a 19 kDa observadas en los geles SDS-PAGE con muestras de fase inferior, corresponda a la Transtiretina. Sin embargo, si la realización posterior de análisis que permitan verificar la hipótesis anterior entregará resultados positivos, es decir, que hay Transtiretina en la fase inferior, se podría concluir que la recuperación de la fase inferior del sistema de dos fases acuosas construido se perfila como una alternativa para una primera etapa dentro del proceso de purificación de Transtiretina.

De la cromatografía de afinidad:

Se realizó una serie de experiencias cromatográficas de afinidad para evaluar la posibilidad de purificar Transtiretina mediante su unión a L-tiroxina inmovilizada en una resina.

Durante la etapa de adsorción del ligando a la resina, se observó que las mejores condiciones de solubilidad de tiroxina en el buffer de acoplamiento se dieron cuando se diluyó a la mitad su concentración, utilizando buffer borato.

Los resultados indican que ambos tipos de muestra aplicadas a la columna de afinidad poseen bandas que podrían corresponder a Transtiretina. La muestra de suero sometida a una columna de inmutafinidad comercial para remover parcialmente la albúmina, presenta cuatro bandas por debajo de los 19 kDa, mientras que en las muestras de fase inferior cargada, sólo se logran distinguir dos bandas. Como ya fue mencionado, no se cuenta con la información suficiente para asegurar que alguna de ellas corresponda a Transtiretina.

El número de lavados realizados no fue suficiente dada la presencia de tenues bandas en todos los geles de elución. Se recomienda agregar un par de lavados con incubación por inmersión o aumentar el volumen de lavado. Por otra parte, se considera que los volúmenes utilizados para las eluciones fueron adecuados.

No se puede concluir con certeza el éxito o fracaso de la cromatografía de afinidad realizada, debido principalmente a la variabilidad de los resultados obtenidos, y cierto grado de inconsecuencia con la información reportada en los antecedentes recopilados (pH de denaturación para la rTTR).

Si se determinara que la banda de PM 10 kDa corresponde a la Transtiretina, se destacaría el hecho de que se obtienen mejores resultados en las cromatografías donde la resina fue incubada con la muestra bajo agitación por inmersión.

En caso de que análisis más específicos determinen que la cromatografía de afinidad no fue exitosa, se postula que la causa más probable de esto corresponde a que la cadena espaciadora utilizado en la resina para exponer el ligando, no tuvo el largo suficiente generando impedimentos estéricos que no permitieron la entrada del ligando (Tiroxina) en el bolsillo de unión de la proteína.

6 BIBLIOGRAFÍA

Albertson P. A., "Partition of cell particles and macromolecules", 3ª Edición, Wiley and Sons, USA, 1986.

Andrea T., Cavalieri R., Goldfine I., and Jorgensen E., "Binding of thyroid hormones and analogues to the human plasma protein prealbumin", *Biochemistry*, 19 (1980): 55-63.

Benavides J., Garza M., Serna-Saldivar S., Rito-palomarews M., "Frationation of human serum using aqueous two phasr systems as a first step for proteomic analysis". En: International conference on biopartitioning and purification (2007), Lisboa, Portugal.

Bollag D., Rozycki M., Edelstein S., "Protein Methods", 2ª Edición, Wiley and Sons, USA, 1986.

Cavallaro T., Martone R. L., Dwork A. J., Schon E. A., and Herbert J., "The retinal pigment epithelium is the unique site of transthyretin synthesis in the rat eye", *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 31 (1990): 497-501.

Chothia C., Lesk A. M., "The relation between the divergence of sequence and structure in proteins", *The European Molecular Biology Organization*, 5 (1986): 823-826.

Clark J., Combs G., Turnbull B., Slate E., Chalker D., Chow J., Davis L., Glover R., Graham G., Gross E., Krongard A., Leshner J., Park H., Sanders B., Smith C., Taylor J., "Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin", *Journal of the American Medical Association*, 276 (1996):1957-1963.

Clark J., Dalkin B., Krongrad A., Combs GF., Turnbull W., "Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial", *British Journal of Urology*, 81 (5) (1998):730-734.

Cohen, S., Chait B., "Mass spectrometry of whole proteins eluted from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels", *Analytical Biochemistry*, 247 (1997): 257-267.

Linke T., Ross A. C., Harrison E., "Proteomic analysis of rat plasma by two-dimentional liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry" *Journal of Chromatography A*, 1123 (2006): 160-169.

Diamond A., Hsu J., "Aqueous two phase systems for biomolecule separation", *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 47 (1992).

Duan W., Richardson S., Kohrle J., Chang L., Southwell B., Harms P., Brack C., Pettersson T., and Schreiber G., "Binding of thyroxine to pig transthyretin, its cDNA structure, and other properties", *European Journal of Biochemistry*, 230 (1995): 977-986.

Epstain C. J., Goldberger R.F., Anfinsen C.B., "The genetic control of tertiary protein structure: studies with model systems", *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 28 (1963):439-449.

Ferguson R. N., Edelhoch H., Saroff H.A., Robbins J., "Negative cooperativity in the binding of thyroxine to human serum prealbumin. Preparation of tritium-labeled 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid", *Biochemistry*, 14 (1975):282-289.

Finley J. W., Davis C., "Selenium from high-selenium broccoli is utilized differently than selenite, selenate, and selenomethionine, but is more effective in inhibiting colon carcinogenesis", *BioFactors* 14, (2001):191-196.

Finley J. W., Davis C., Feng Y., "Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer", *Journal of Nutrition*, 130 (2000):2384-2389.

Fiser A., Gian Do R., Sali A., "Modeling of loops in protein structures", *Protein Science*, 9 (2000): 1753-1773.

Goran F., Laurell C., Thulin E., "Purification of prealbumin from human and canine serum using a two step affinity chromatographic procedure", *European Journal of Biochemistry*, 75 (1977): 181-186.

Ingenbleek Y., Young V., "Transthyretin (Prealbumin) in health and disease: nutritional implications", *Annual Reviews of Nutrition*, 14 (1994): 495-533.

Sander C., Schneider R., "Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment", *Proteins*, 9 (1991): 56-68.

Ip C., Birringer M., Block E., Kotrebai M., Tyson J., Uden P., Lisk D., "Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6) (2000): 2062-2070.

Kabat EA., Moore D., Landow H., "An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins", *Journal of Clinical Investigation*, 45 (1942): 571-577.

Kawaji T., Ando Y., Nakamura M., Yamamoto K., Ando E., Takano A., Inomata Y., Hirata A., and Tanihara H., “Transthyretin synthesis in Rabbit ciliary pigment epithelium”, *Experimental Eye Research*, 81 (2005): 306-312.

Kune G., Watson L., “Colorectal cancer protective effects and the dietary micronutrients folat, methionine, vitamins B6, B12, C, E, selenium, and lycopene”, *Nutrition and Cancer*, 56 (2006):11-21.

Larsson M., Pettersson T., Carlstrom A., “Tyroid hormone in serum of 15 vertebrate species, Isolation of thyroxine-binding globulin and prealbumin analogs”, *General and Comparative Endocrinology*, 58 (1985): 360-75.

Li L., Xie Y., El-Sayed WM., Szakacz JG., Franklin MR., Roberts J. C., “Chemopreventive activity of selenocysteine prodrugs against tobacco-derived nitrosamine (NNK) – induced lung tumors in the A/J mouse”, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19 (6) (2006): 396-405.

Lin Q., Su T., Liu G., Gu J., “Purification of tranthyretin by high performance affinity chromatography from human plasma”, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, Abstract, 26 (1996): 245.

Lienqueo M. E., Mahn A., Asenjo J. A., “Mathematical correlations for predicting protein retention times in hydrophobic interaction chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 978 (2002): 71-79.

Mahley R., Innerarity T., Rall S. Jr., and Weisgraber K., “Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function”, *Journal of Lipid Research*, 25 (1984): 1227-1294.

Mahn A., Toledo H., Ruz M., Olivera-Nappa A., “Dietary supplementation with selenomethylselenocysteine produces a differential proteomic response”, *Journal of Nutritional Biochemistry* (2008) en prensa.

Martí-Renom M., Stuart A., Fiser A., Sánchez R., Melo F., Sali A., “Comparative protein structure modeling of genes and genomes”, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*”, 29 (2000): 291-325.

Mistry S. L., Kaul A., Merchuck J. C., Asenjo J. A., “Mathematical modeling and computer simulation of aqueous two phases continuous protein extraction”, *Journal of Chromatography A*, 741 (1996): 151-163.

Miyazawa S., Jernigan R. L., “Estimation of effective interresidue contact energies from protein crystal structures: quasi-chemical approximation”, *Macromolecules*, 18 (1985): 534-552.

Navab M., Mallia K. A., Kanda Y., Goodman DW., “Rat plasma prealbumin: isolation and partial characterization”, *Journal of Biological Chemistry*, 252(14) (1977): 5100-5106.

Nomenclature Committee of IUB (NC-IUB), IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature, Carta 1981, *Journal of Biological Chemistry*, 256 (1981): 12-14.

Pharmacia, Development Technique File N° 210, “Sensitive silver staining”, PhastSystem™.

Pharmacia, Separation Technique File N° 110, “SDS-PAGE”, PhastSystem™.

Pharmacia, Separation Technique File N° 100, “IEF and electrophoretic titration curve analysis”, PhastSystem™.

Pierce Biotechnology, Inc, “Purify proteins from polyacrylamide gels”, Technical Resource, 1994.

QIAGEN, Qproteome™ Murine Albumin Depletion Handbook, (2005).

Rost B., “Twilight zone of protein sequence alignments”, *Protein Engineering Design and Selection*, 12 (1999): 85-94.

Sabu L., Vranckx R., Maya M., Nunez EA., “A thyroxine binding globulin (TGB)-like protein in the sera of developing and adults rats”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 148 (1987): 1165-1173.

Shen M., Sali A., “Statistical potential for assessment and prediction of protein structures”, *Protein and Science*, 15 (2006): 2507-2524.

Shi J., Blundell T., Mizuguchi K., “FUGUE: Sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties”, *Journal of Molecular Biology*, 310 (2001): 243-257.

Skoulakis S. and Goodfellow J. M., “The pH-dependent stability of wild-type and mutant transthyretin oligomers”, *Biophysical Journal*, 84 (2003): 2795-2804.

Unni E., Koul D., Young WK., Sinha R., “Se-methylselenocysteine inhibits phosphatidylinositol 3-kinase activity of mouse mammary epithelial tumor cells in vitro”, *Breast Cancer Research*, 7 (5) (2005):600-707.

Vadhanavikit S., Ip C., Ganther H., “Metabolites of sodium selenite and methylated selenium compounds administered at cancer chemoprevention levels in the rat”, *Xenobiotica*, 23 (1993): 731-745.

Vahlquist A., Nilsson S., and Peterson P., “Isolation of human retinol binding protein by affinity chromatography”, *European Journal of Biochemistry*, 20 (1971): 160-168.

Wojtczak A., Cody V., Luft J. R., and Pangborn W., “Structure of rat transthyretin (rTTR) complex with thyroxine at 2,5 Å resolution: first non-biased insight into thyroxine binding reveals different hormone orientation in two binding sites”, *Acta Crystallographica*, D57 (2001): 1061-1070.

Zhuo H., Smith AH., Steinmaus C., “Selenium and lung cancer a quantitative analysis of heterogeneity in the current epidemiological literature”, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 13 (5) (2004):771-778.

ANEXO I: Escala de hidrofobicidad de Miyazama-Jernigan.

Tabla 11: Escala de hidrofobicidad de los aminoácidos propuesta por Miyazama y Jernigan.

Aminoácido	Hidrofobicidad	Hidrofobicida Normalizada
ALA	5,33	0,392
ARG	4,18	0,202
ASN	3,71	0,125
ASP	3,56	0,100
CYS	7,93	0,819
PHE	9,03	1,000
GLY	4,48	0,252
GLN	3,87	0,151
GLU	3,65	0,115
HIS	5,1	0,354
ILE	8,83	0,967
LEU	8,47	0,908
LYS	2,95	0,000
MET	8,95	0,987
PRO	3,87	0,151
SER	4,09	0,188
TYR	5,89	0,484
THR	4,49	0,253
TRP	7,66	0,775
VAL	7,63	0,770

ANEXO II: Pruebas de sensibilidad *PhastSystem*.

Prueba de sensibilidad para geles de isoelectroenfoque

A continuación se presenta una serie de recomendaciones para la realización de geles de isoelectroenfoque (IEF) teñidos con nitrato de plata cuando las concentraciones de proteína a cargar son muy pequeñas. Para el procedimiento se utilizó un gel *PhastGel* IEF para punto isoelectroenfoque entre 3 y 9.

Para aumentar la cantidad de proteína que se pretende visualizar en el gel, se cargaron las muestras más diluidas (carriles 2, 3, 4, y 5) en tres peinetas, cada una de seis pocillos de 4 uL. Esto implica que se cargaron las siguientes cantidades de proteína:

Carril 2: 18 ng de BSA

Carril 3: 60 ng de BSA

Carril 4: 180 ng de BSA

Carril 5: 600 ng de BSA

Una vez ejecutado el programa estándar de separación para el gel utilizado (recomendado por los archivos técnicos del equipo), se llevó a cabo procedimiento de tinción con nitrato de plata indicado en la tabla presentada a continuación.

Tabla 12: Procedimiento de tinción realizado para la prueba de sensibilidad de detección en geles IEF, en el equipo *PhastSystem*.

Paso	Solución	Tiempo (min)	Operación
1	20% TCA	5	Automática
2	50% Etanol, 10% Ácido Acético	2	Automática
3	10% Etanol, 5% Ácido Acético	2	Automática
4	10% Etanol, 5% Ácido Acético	4	Automática
5	8.3% Glutraldehído	6	Automática
6	10% Etanol, 5% Ácido Acético	3	Automática
7	10% Etanol, 5% Ácido Acético	5	Automática
8	Agua Mili Q	2	Automática
9	Agua Mili Q	2	Automática
10	0.5% AgNO ₃	10	Manual
11	Agua Mili Q	0,5	Manual
12	Agua Mili Q	0,5	Manual
13	2.5% NaCO ₃ , 0,015% Formaldehído	0,5	Manual
14	2.5% NaCO ₃ , 0,015% Formaldehído	Variable	Manual
15	5% Ácido Acético	5	Manual

Entendiéndose por operación automática un paso llevado a cabo en la unidad de revelado del equipo *PhastSystem* y por manual una operación realizada fuera de él.

El paso 14 se lleva a cabo hasta que se visualice de manera adecuada las muestras cargadas.

Se debe utilizar guantes durante todos los procesos manuales.

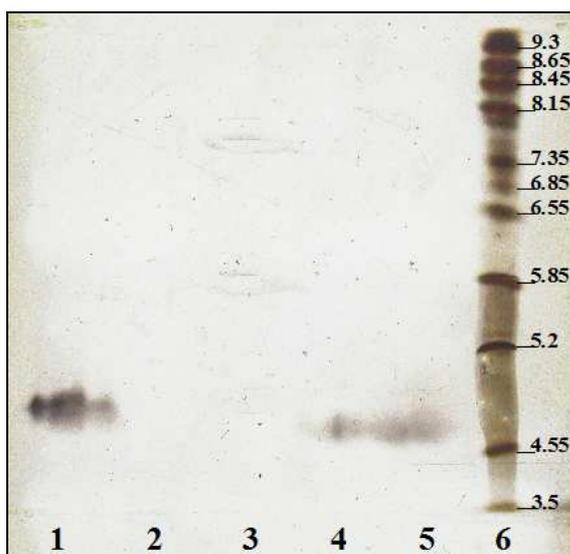


Figura 29: Gel IEF obtenido según el procedimiento descrito. 1) 0,1 mg/mL de BSA, 2) 0,0015 mg/mL de BSA, 3) 0,005 mg/mL de BSA, 4) 0,015 mg/mL de BSA, 5) 0,05 mg/mL de BSA, 6)

Como se aprecia en la **Figura 29**, no fue posible apreciar las muestras de los carriles 2 y 3, que corresponden a las muestras con menor concentración. Esto ocurre, a pesar que la cantidad de proteína cargada por cada banda es ampliamente superior al límite de sensibilidad reportado para el método de tinción con plata (1 a 5 ng).

Prueba de sensibilidad para geles SDS-PAGE y evaluación de la efectividad de la liofilización

Esta prueba tiene dos objetivos:

1° Analizar visualmente la posible pérdida de proteína luego del proceso de liofilizado.

2° Visualizar la supuesta concentración máxima de proteína a obtener luego de los procesos de extracción desde trozos de geles de acrilamida denaturantes.

Para cumplir el primer objetivo, se liofilizaron dos soluciones de BSA. La primera muestra liofilizada corresponde a 100 μ L de solución de BSA 0,2 mg/mL. El *pellet* obtenido fue resuspendido en 64 μ L de buffer de muestra. La segunda muestra corresponde a 100 μ L de una solución de BSA 0,1 mg/mL, el *pellet* resultante también fue resuspendido en 64 μ L de buffer de muestra.

Además, se utilizó como control dos soluciones de BSA cuya concentración permite cargar la misma cantidad de proteína que la cargada con las muestras liofilizadas. Esto permite asegurar

que si no se aprecian bandas asociadas a las muestras liofilizadas, es debido a que la proteína se perdió durante el proceso y no debido a problemas de sensibilidad del gel. Las concentraciones de estas soluciones fueron de 0,313 mg/mL (símil de la muestra liofilizada 0,2 mg/mL) y 0,156 mg/mL (símil de la muestra liofilizada 0,1 mg/mL).

Así en los carriles 1 y 3 se cargaron 1000 ng de proteína y en los carriles 2 y 4, 500 ng.

Para verificar el segundo objetivo, se preparo una solución de BSA a la concentración máxima esperada (0,00375 mg/mL) que corresponde a la concentración obtenida si se liberaran, por el procedimiento de extracción, los 75 ng de proteína por trozo de gel, se liofilizara la muestra y luego se resuspendiera en 20 μ L de buffer de muestra.

Para este procedimiento de electroforesis denaturante se utilizó un gel PhastGel con gradiente 8-25, que permite separar proteínas denaturadas con pesos moleculares entre 6 kDa y 300 kDa. El procedimiento de separación ejecutado, al igual que el protocolo de tinción con nitrato de plata, fueron los recomendados en los archivos técnicos del equipo para el tipo de gel utilizado.

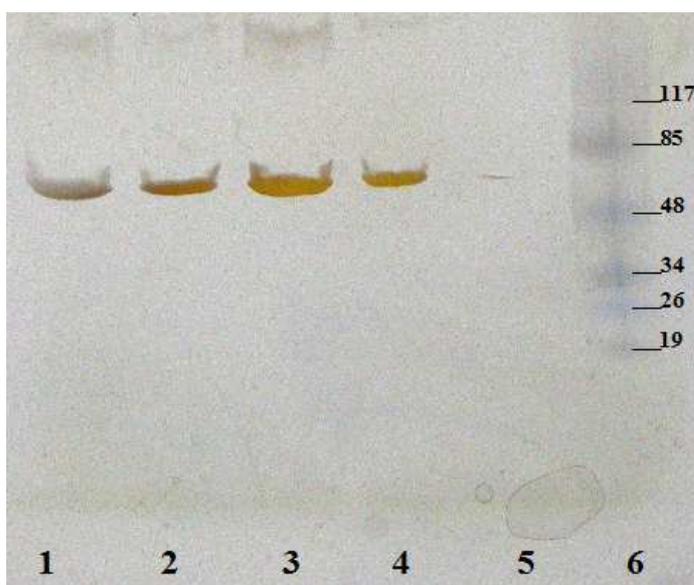


Figura 30: Gel SDS-PAGE realizado con muestras estándar de BSA y muestras sometidas a liofilización. 1) Solución de BSA 0,313 mg/mL, 2) Solución de BSA 0,156 mg/mL, 3) Muestra BSA 0,2 mg/mL liofilizada, 4) Muestra BSA liofilizada 0,1 mg/mL liofilizada, 5) Muestra BSA 0,00375 mg/mL.

Como resultado se obtuvo el gel presentado en la Figura 30. Aquí se aprecian claramente las bandas asociadas a cada una de las muestras cargadas, incluso se logra distinguir la banda que contiene aproximadamente 12 ng de proteína, asociada a la muestra de menor concentración.

Además se deduce que el proceso de liofilización fue exitoso ya que la intensidad de las bandas de los carriles 1 y 3 y 2 y 4, son bastante similares.

Así, si bien el límite de sensibilidad para este método es de 0,3 a 0,5 ng por banda, se determina que una banda que contiene 12 ng (40 veces más que el límite inferior) es apenas visible, por lo que muestras con concentraciones menores a 0,00375 mg/mL difícilmente serán visualizadas.

residuo del alineamiento. El quinto y sexto campo indican el número de residuo y la cadena a la que pertenece el último aminoácido del alineamiento. Del séptimo al décimo campo son optativos, y reportan el nombre de la proteína, el microorganismo fuente, la resolución cristalográfica con que fue obtenido el modelo, y el factor R del análisis cristalográfico, respectivamente. Siempre debe haber diez campos en la segunda línea, los campos que no se identifican se dejan en blanco. Finalmente, cada secuencia debe terminar con un asterisco (*).

2. Comparación de templados

```
from modeller import *

env = environ()
aln = alignment(env)
for (pdb, chain) in (('1AEP', 'A'), ('1BZ4', 'A'), ('1OEF', 'A'),
                    ('1QOY', 'A'), ('2A01', 'A'), ('2J69',
                    'A')):
    m = model(env, file=pdb, model_segment=('FIRST:'+chain,
    'LAST:'+chain))
    aln.append_model(m, atom_files=pdb, align_codes=pdb+chain)
aln.malign()
aln.malign3d()
aln.compare_structures()
aln.id_table(matrix_file='family.mat')
env.dendrogram(matrix_file='family.mat', cluster_cut=-1.0)
```

Donde la cadena de A de la proteína cuyo código en la base de datos *Protein Data Bank* es 1AEP. Lo mismo para 1BZ4, 1OEF, 1QOY, 2A01, 2J69. Este código entrega un archivo de texto donde los datos más relevantes, corresponden a una matriz de comparación entre los templados y un dendograma basado en una matriz de distancia que permite apreciar las diferencias entre los templados.

3. Verificación del alineamiento

```
from modeller import *

log.level(output=1, notes=1, warnings=1, errors=1, memory=0)
env = environ()
env.io.atom_files_directory = '../atom_files'

aln = alignment(env)
aln.append(file='align-multiple.ali', align_codes='all')
aln.write(file='align-multiple.pap', alignment_format='PAP')
aln.write(file='align-multiple.fasta', alignment_format='FASTA')
aln.check()
```

Donde el archivo `align-multiple.ali` corresponde al nombre asignado al archivo que contiene el alineamiento entre los templados y la secuencia blanco.

4. *Modelamiento*

```
from modeller import *
from modeller.automodel import *

log.verbose()
env = environ()

env.io.atom_files_directory = './:../atom_files'

a = automodel(env,
              alnfile = 'align-multiple.ali',
              knowns   = ('2A01', '1OEF'),
              sequence = 'P02650',
              assess_methods=(assess.DOPE, assess.GA341))

a.starting_model= 1
a.ending_model  = 50

a.make()
```

Este código genera 50 modelos tridimensionales de la proteína con código P02650 que incluyen todos los átomos salvo los de hidrógeno, a partir del alineamiento seleccionado. Además calcula la energía DOPE y el puntaje GA341 para cada uno de ellos. Si se requiere incluir los átomos de hidrógeno en el modelo, basta con crear la variable “a” con la función *allhmodel* en vez de la función *automodel*.

5. *Generación de los perfiles de energía DOPE*

```
from modeller import *
from modeller.scripts import complete_pdb

log.verbose()
env = environ()
env.libs.topology.read(file='${LIB}/top_heav.lib')
env.libs.parameters.read(file='${LIB}/par.lib')

mdl = complete_pdb(env, 'XXXX.pdb')

s = selection(mdl)
s.assess_dope(output='ENERGY_PROFILE NO_REPORT',
              file='XXXX.profile',
```

```
normalize_profile=True, smoothing_window=15)
```

El perfil de energía así generado se guarda en el archivo *XXXX.profile*, el cual se grafica utilizando el programa GNUplot.

6. Refinamiento de bucles.

```
from modeller import *
from modeller.automodel import *

log.verbose()
env = environ()

env.io.atom_files_directory = './:../atom_files'

class myloop(loopmodel):

    def select_loop_atoms(self):
        return selection(self.residue_range('220','230'),
                        self.residue_range('279','294'),
                        self.residue_range('1','10'),
                        self.residue_range('247','257'))

m = myloop(env, inimodel='P02650.pdb', sequence='P02650')

m.loop.starting_model= 1
m.loop.ending_model  = 50
m.loop.md_level = refine.very_fast

m.make()
```

Este código entrega 50 modelos tridimensionales basados en el modelo *P02650.pdb*, donde las zonas comprendidas por los aminoácidos 1-10, 220-230, 247-257, y 279-294 han sido modeladas utilizando la metodología de refinamiento de bucles.

ANEXO IV: Protocolo de utilización de GRASP.

Se debe ingresar al programa GRASP abriendo una ventana de Unix con los siguientes comandos:

Desktop → Open Unix Shell. Luego se debe escribir: grasp

Con estas instrucciones aparece una pantalla gráfica de GRASP. Luego, hay que seleccionar una proteína con los siguientes comandos (utilizando el botón derecho del mouse):

Panels → Reading Files → PDB Files → Seleccionar la estructura de la proteína a analizar (extensión .pdb)

Luego, con la información disponible en el archivo de estructura tridimensional, se debe construir la superficie accesible al solvente con los siguientes comandos:

Calculate → Molecule → Molecule → Accesible Area → All Atoms

Una vez construida la superficie, se requiere que el programa calcule las áreas accesibles para cada aminoácido, para esto se siguen las siguientes instrucciones.

- 1.) Calculate
- 2.) Simple Property Math
- 3.) Atoms Properties
- 4.) Enter String

Se debe escribir en pantalla: r = ala (o cualquier aminoácido en código de tres letras) y se continúa con:

- 5.) Op (Array)=Scalar
- 6.) Sum of Values

7.) Accessible Area

Estos pasos deben repetirse para cada uno de los 20 aminoácidos, es decir, empezar en el punto 1 hasta el 7 escribiendo cada vez, el código de 3 letras de cada uno de los 20 aminoácidos.

Al seguir estos pasos se consigue obtener las áreas accesibles de cada aminoácido y el área accesible de la proteína completa

ANEXO V: Protocolos estándar.

1. Protocolo de precipitación con Ácido Tricloroacético (TCA). (Protein Methods, Bollag y otros, 1996)

Reactivos:

- Ácido Tricloroacético (TCA), CCl_3COOH Grado analítico. (Merck)
- Acetona 100%, $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ Grado analítico. (Merck)

Protocolo:

- Agregar 200 μL de TCA a 2 mL de muestra. Ambos se mezclan utilizando un vortex.
- Incubar por 30 minutos en hielo.
- Centrifugar a 10.000xg por 5 minutos.
- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante utilizando una pipeta.
- Lavar bien el pellet con 1 mL de acetona.
- Nuevamente centrifugar a 10.000xg por 5 minutos.
- Eliminar la acetona de los tubos y dejar secar el pellet por evaporación de la acetona al ambiente.

2. Protocolo geles de Poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE)

Reactivos:

- Acrilamida-Bisacrilamida 29:1. (Winkler)
- Tris Base, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ Biología molecular. (Winkler)
- DodecilSulfato de Sodio (SDS), $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$, Biología molecular. (Winkler)
- Ácido Clorhídrico fumante 37%, HCl (Merck)
- 2-mercaptoetanol
- Azul de bromofenol.
- Glicerol $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$. (Merck)
- Glicina, $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ Biología molecular. (Winkler)
- Persulfato de Amonio (PSA). (GibcoBRL)
- Temed. (Invitrogen)
- Marcador de peso molecular preteñido, rango de separación 117- 19 kDa, contiene β -Galactosidasa (117 kDa), Albúmina de suero bovino (85 kDa), Ovalbúmina (48 kDa), Anhidrasa Carbónica (34 kDa), β -Lactoglobulina (26 kDa) y Lisozima (19 kDa). (Fermentas)

- Marcador de peso molecular, rango de separación 220-10 kDa, contiene 15 proteínas. (220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10) (Invitrogen)

Soluciones:

- Buffer gel de resolución: 1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8.
- Buffer gel de concentración: 0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 6.8.
- Buffer de corrida 10x: 25 M Tris Base, 1,92 M glicina, 0,1% v/v SDS.
- Buffer de carga 5X: 60 mM Tris-HCl, 25% v/v glicerol, 2% p/v SDS, 14,4 mM 2-mercaptoetanol y 0,1% p/v azul de bromofenol, pH 6,8.
- PSA 10% p/v.

Protocolo:

Para realizar la electroforesis SDS-PAGE se utilizó una cámara vertical MiniProtean II (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA). Los geles de acrilamida fueron preparados según la Tabla 13 y Tabla 14.

Tabla 13: Reactivos y volúmenes utilizados para la fabricación de los geles de resolución al 12,5%.

Reactivo	Volumen
Acrilamida Bisacrilamida 29:1	1,58 mL
Buffer gel de resolución	0,95 mL
Agua destilada	1,27 mL
PSA 10%	20 μ L
TEMED	2 μ L

Tabla 14: Reactivos y volúmenes utilizados para la fabricación de los geles de concentración.

Reactivo	Volumen
Acrilamida Bisacrilamida 29:1	0,17 mL
Buffer gel de concentración	0,25 mL
Agua destilada	0,58 mL
PSA 10%	7,5 μ L
TEMED	1,25 μ L

Las muestras se mezclaron en proporción 4:1 con Buffer de carga 5X y se cargaron en gel de acrilamida. Para la aplicación del campo eléctrico necesario para la separación de las proteínas, se utilizó una fuente de poder (Power Pac 1000 de Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA). Las

electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 200 V, utilizando 800 mL de buffer de corrida.

3. Protocolo de tinción con Azul de Coomassie. (Protein Methods, Bollag y otros, 1996)

Reactivos:

- Brilliant Blue R. (Sigma)
- Metanol, CH₃OH Grado técnico. (TCL)
- Ácido Acético, CH₃COOH Grado técnico. (TCL)

Soluciones:

- **Solución de Tinción:** 1gr/L de Brilliant Blue R en 45% v/v de metanol, 10% v/v de ácido acético, 45% v/v de agua mili-Q.
- **Solución de Distinción:** 45% v/v de metanol, 10% v/v de ácido acético, 45% v/v de agua mili-Q.

Protocolo

- Incubar los geles con agitación suave, por al menos 30 minutos, en el volumen suficiente de solución de tinción para cubrir completamente el gel.
- Posteriormente, incubar el gel por toda la noche en solución de distinción bajo agitación.

4. Protocolo de tinción con Nitrato de Plata.

Reactivos:

- DL-Ditiotreitol (DTT), C₄H₁₀O₂S₂ Biología molecular. (Merck)
- Nitrato de Plata, AgNO₃ Grado analítico. (Merck)
- Carbonato de Sodio, NaCO₃ Grado analítico. (Merck)
- Formaldehído 37%, CH₂OH Grado analítico. (Merck)
- Ácido Cítrico, C₆H₈O₇*H₂O Grado analítico. (Merck)
- Agua mili-Q

Soluciones:

- **Solución de Ditiotreitol (DTT):** 0.005 mg/ mL de DTT.

- **Solución de Tinción:** 1 mg/mL de Nitrato de Plata.
- **Solución de Revelado:** Para la preparación de 250 mL de solución de revelado, se deben agregar 9 gr. de Carbonato de Sodio y 0.15 mL de Formaldehído al 37%, en agua mili-Q.

Protocolo:

- Lavar los geles con agua mili-Q por una hora bajo agitación. Cambiar el agua cada 15 minutos.
- Remojar los geles en solución de DTT por 30 minutos con el volumen necesario para cubrir completamente el gel, bajo agitación.
- Botar el DTT y agregar hasta cubrir la solución de tinción. Incubar a oscuras por 30 minutos con agitación.
- Botar la solución de tinción y agregar una pequeña cantidad de solución de distinción, agitar suavemente para remover el exceso de solución de tinción. Eliminar. Luego agregar la solución de revelado hasta cubrir. Incubar hasta que aparezcan las bandas de proteínas.
- Para detener la reacción, agregar 6 gr. Ácido Cítrico en polvo.

5. Protocolo método de cuantificación de proteínas: Bradford modificado.

Reactivos:

- Brilliant Blue G, $C_{47}H_{48}N_3O_7S_2Na$. (Sigma-Aldrich)
- Ácido clorhídrico fumante 37%, HCl Grado analítico. (Merck)

Soluciones:

- **Reactivo Bradford:** Aproximadamente 1 gr/L de Brilliant Blue R en 2,2% de HCl. Se agita toda la noche, luego se filtra y se mide su absorbancia a 450nm para comprobar que se encuentre entre 1,3 y 1,5. De no ser así, la solución se diluye si es que se registra un absorbancia mayor que 1,5 o se le agrega más Brilliant Blue R si su absorbancia es menor que 1,3.

Protocolo:

- Mezclar en una cubeta de espectrofotómetro 1.2 mL de agua mili-Q, 0.5 mL de reactivo Bradford, y 50 μ L de la muestra a analizar.
- Medir la absorbancia a 465 y 595 nm, utilizando como blanco la misma mezcla anterior pero reemplazando los 50 μ L de muestra por agua.

- Fabricar una curva de calibración utilizando muestras de concentración conocida.
- Se grafica el cociente Abs 595/Abs465 normalizada por el blanco versus la concentración.
- Se interpola el cociente obtenido para la muestra de interés y se obtiene la concentración que posee.

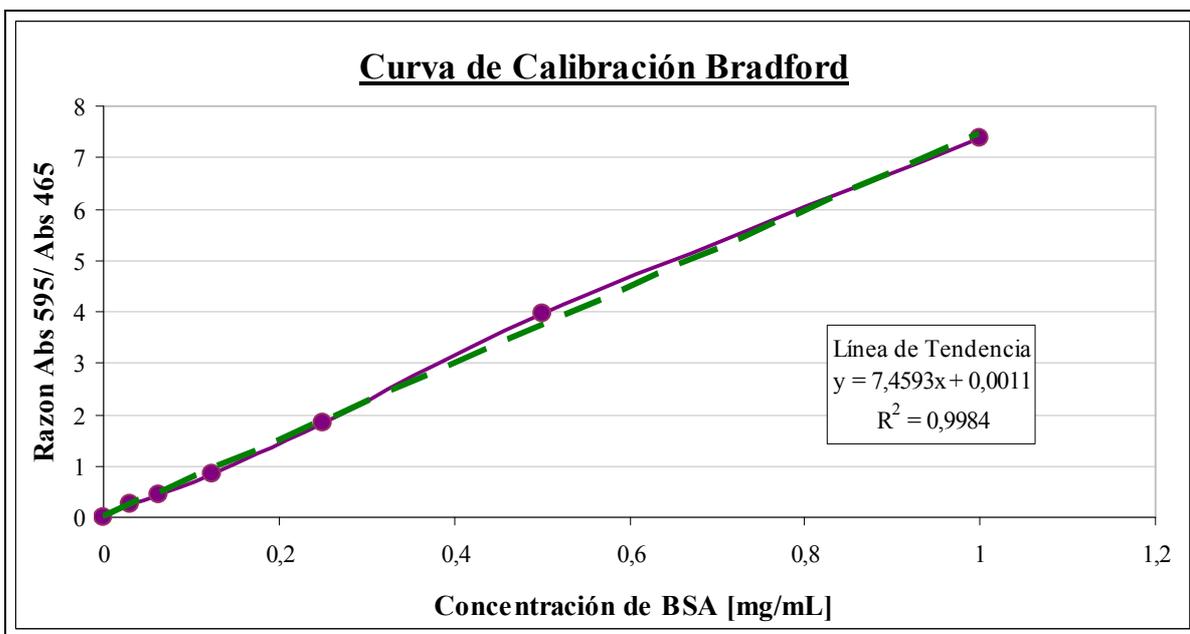


Figura 31: Curva de calibración utilizada para determinar la concentración de cada fase del sistema ATPS.

ANEXO VI: Curva de calibración de absorbancia a 280 nm.

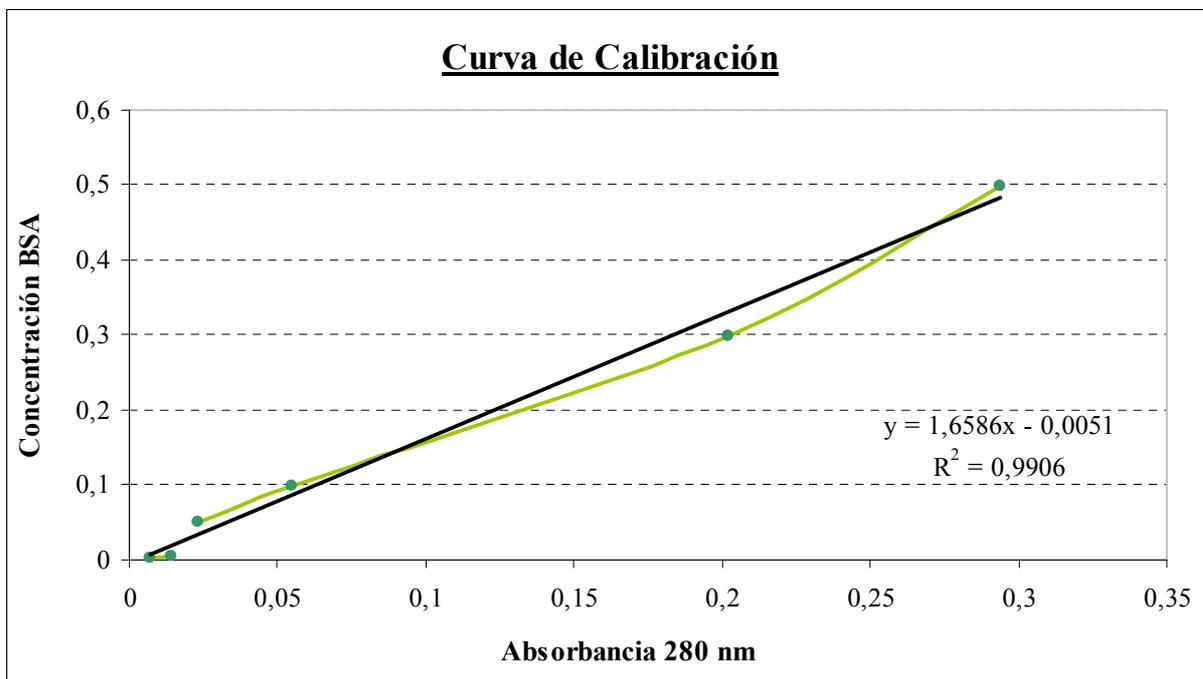


Figura 32: Curva de calibración utilizada para determinar la concentración de proteína obtenida desde el primer protocolo de extracción.

ANEXO VII: Áreas superficiales por aminoácido para cada estructura de rTTR y ApoE.

Tabla 15: Áreas superficiales entregadas por GRASP para cada uno de los aminoácidos de rTTR.

	Código de la estructura disponible			
	1GKE	1IE4	1KGI	1KGJ
Aminoácido	Área superficial expuesta [Å ²]			
ALA	1107,30	979,45	772,21	1024,87
ARG	759,34	687,42	646,94	730,03
ASN	1116,09	1064,88	1022,60	1144,77
ASP	1358,05	1492,10	1341,52	1254,70
CYS	107,40	83,14	163,93	72,45
PHE	337,13	278,30	190,21	235,67
GLY	862,24	908,26	757,49	773,14
GLN	631,87	653,04	651,75	650,00
GLU	2061,70	2168,41	2051,33	2640,22
HIS	593,91	630,68	705,20	587,89
ILE	184,93	166,33	144,56	178,79
LEU	631,79	343,53	294,34	394,69
LYS	2895,69	2536,33	1919,87	2397,97
MET	102,97	74,40	104,54	93,01
PRO	764,67	762,74	692,53	631,70
SER	2168,22	1972,47	1610,44	1750,03
TYR	390,73	340,31	110,47	272,67
THR	946,47	766,12	696,26	737,86
TRP	320,18	277,45	219,38	232,04
VAL	574,14	496,95	238,76	514,04
TOTAL	17914,84	16682,28	14334,31	16316,55

Tabla 16: Áreas superficiales por tipo de aminoácido y total, obtenida para tres modelos generados de las estructura de ApoE.

	Código de la estructura disponible		
	Modelo 22.17	Modelo 22.20	Modelo 22.48
Aminoácido	Área superficial expuesta [Å²]		
ALA	1378,12	1474,80	1325,56
ARG	3924,80	3988,21	3945,48
ASN	830,64	837,88	859,80
ASP	802,96	909,03	839,74
CYS	0,00	0,00	0,00
PHE	377,15	317,24	327,96
GLY	564,49	613,02	632,06
GLN	3256,06	3282,01	3239,86
GLU	4026,02	3780,78	4019,62
HIS	24,30	24,30	24,30
ILE	450,54	554,02	391,23
LEU	2367,54	2314,29	2278,64
LYS	1079,94	1194,31	1139,20
MET	953,96	959,54	768,81
PRO	487,33	584,29	501,91
SER	848,46	865,04	821,59
TYR	346,00	346,00	346,18
THR	1112,05	1010,07	1139,67
TRP	624,38	533,64	567,10
VAL	1215,85	1185,52	1215,11
TOTAL	28632,95	24773,99	24383,81

ANEXO VIII: Perfiles energéticos DOPE de los modelos 22, 24 y 33.

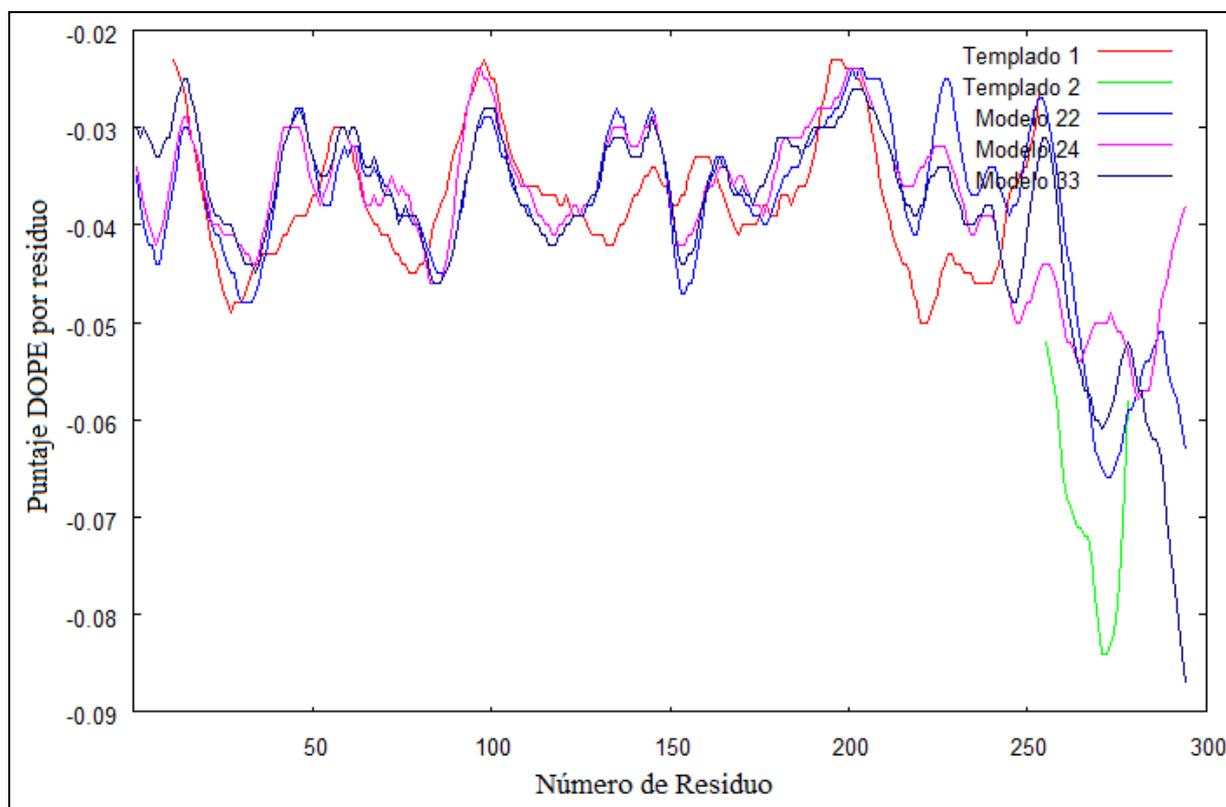


Figura 33: Comparación de perfiles energéticos DOPE, modelos 22, 24, y 33. Además se presenta el templado principal 2A01 y el secundario 1OEF.

ANEXO IX: Gráficos de Ramachandran para los modelos 22.17, 22.20 y 22.48

Los gráficos que se presentan a continuación se obtuvieron con el programa Deep View. Se observan más aminoácidos destacados que los mencionados en el resultado obtenidos por PROCHECK, sólo porque el programa de evaluación define ciertos contornos exteriores de las zonas mostradas en los gráfico inferiores como “zonas generosamente permitidas”, y considera que los aminoácidos que se encuentran en dicha zona, no son motivo de problemas que requieran una evaluación más detallada.

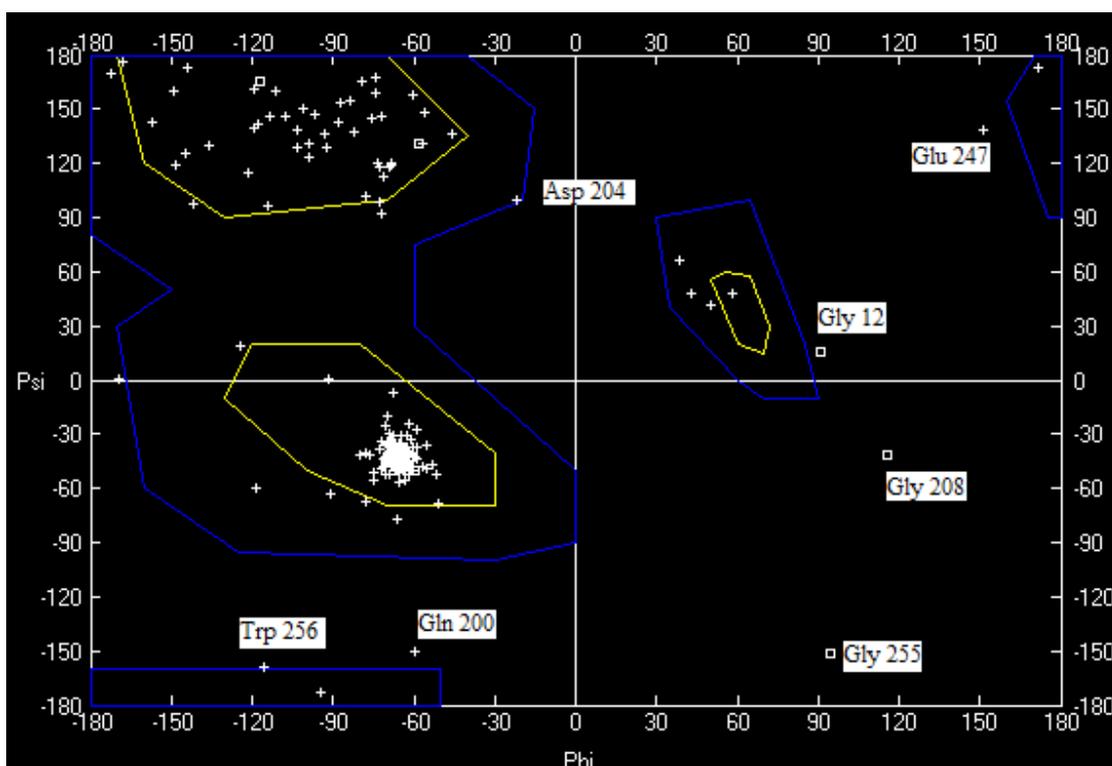


Figura 34: Gráfico de Ramachandran para modelo 22.17. Se indican los aminoácidos fuera de las zonas permitidas.

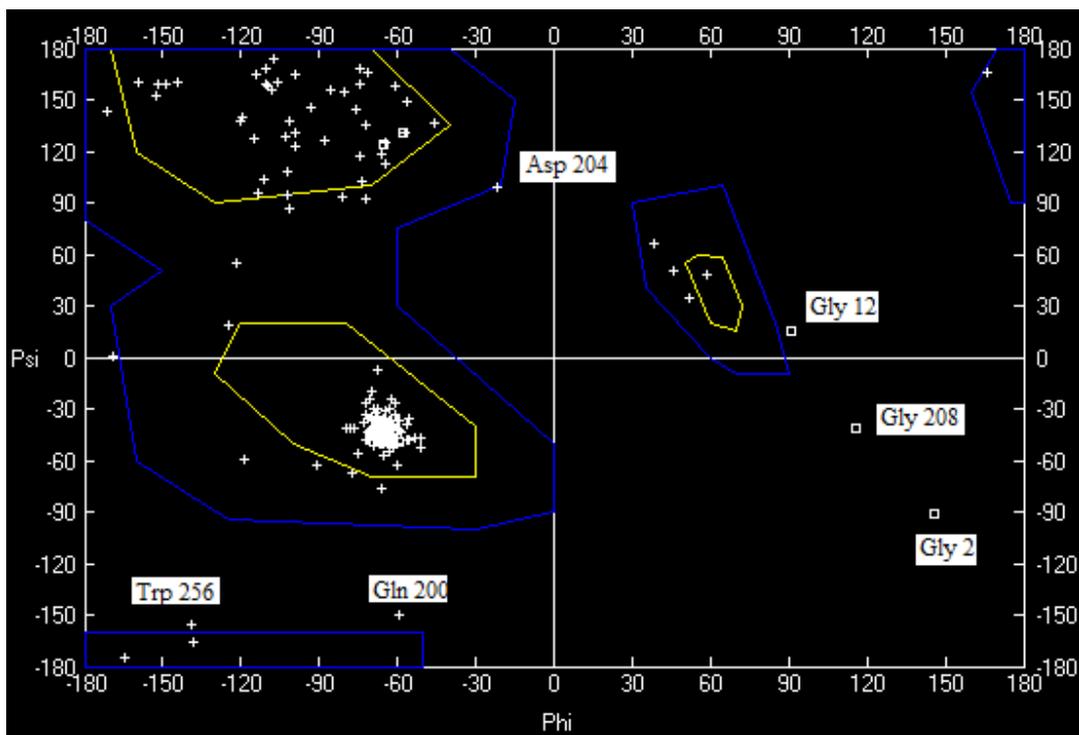


Figura 35: Gráfico de Ramachandran del Modelo 22.20.

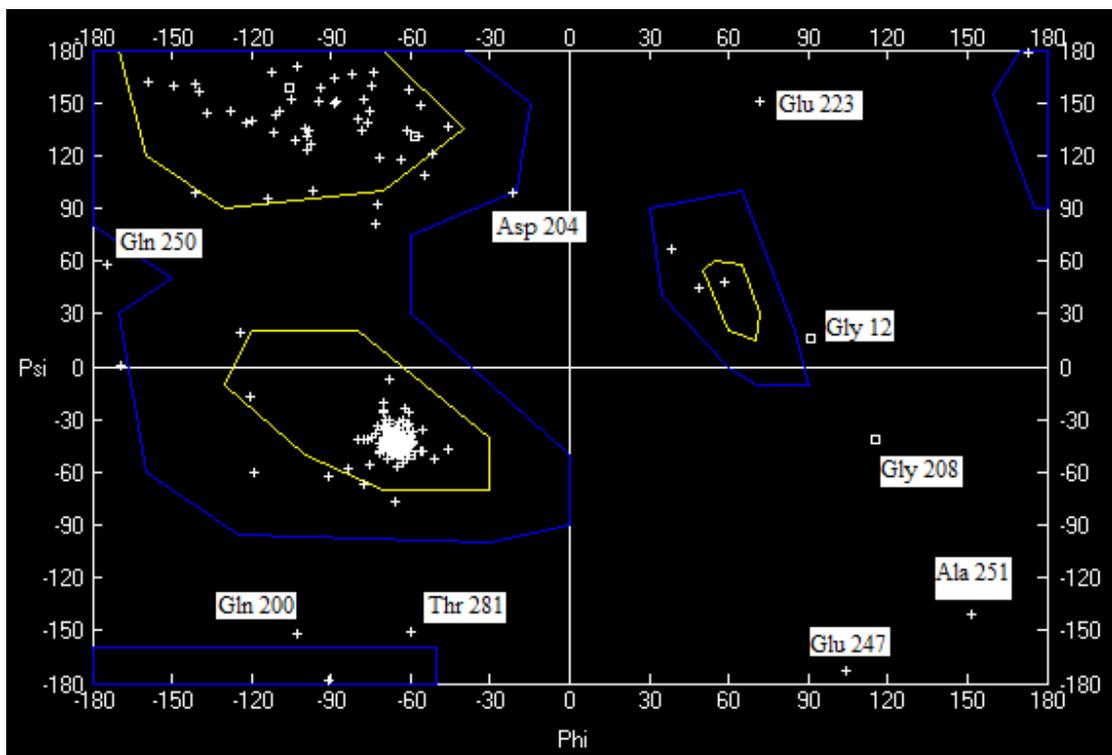


Figura 36: Gráfico de Ramachandran del Modelo 22.48.